Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale,, n. 61 del 13 marzo 2004 - Serie generale

Spediz. abb. post. 45% - art. 2, comma 20/b
Legge 23-12-1996, n. 662 - Filiale di Roma

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA **Roma - Sabato, 13 marzo 2004** SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 06 85081

N. 42

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETO 23 febbraio 2004.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi biochimica del suolo.

SOMMARIO

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETO 23 febbraio 2004. — *Approvazione dei metodi ufficiali di analisi biochimica del suolo* ... *Pag.* 5

I. DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA MICROBICA

I.1. Determinazione della biomassa microbica del suolo per fumigazione ... » 7

I.1.1. Fumigazione con cloroformio ... » 7

I.1.2. Determinazione del contenuto di carbonio della biomassa microbica (B_C) col metodo fumigazione-incubazione (FI) ... » 8

I.1.3. Determinazione dell'azoto della biomassa microbica (B_N) col metodo fumigazione-incubazione (FI) ... » 10

I.1.4. Determinazione di B_N e B_C col metodo fumigazione-estrazione (FE) ... » 12

I.2. Determinazione dell'ATP estratto con acido fosforico ... » 16

II. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA BIOMASSA MICROBICA

II.1. Determinazione della respirazione del suolo ... » 17

II.1.1. Determinazione della CO_2 sviluppata dalla biomassa microbica del suolo per metodo titrimetrico ... » 17

II.1.2. Determinazione della respirazione del suolo nel SAPROMAT ... » 19

II.1.3. Stima della respirazione del suolo con l'apparato WŒSTHOFF ... » 19

II.1.4. Analisi del gas evoluti dalla biomassa microbica del suolo mediante la tecnica a infrarossi » 20

II.2. Determinazione del potere mineralizzante del suolo ... » 21

II.2.1. Metodo di estrazione con acqua bollente ... » 21

II.2.2. Metodo del permanganato di potassio in ambiente acido ... » 22

II.2.3. Metodo di estrazione con una soluzione di $CaCl_2$ in autoclave ... » 22

II.2.4. Metodo bochimico di Bremner ... » 23

II.2.5. Metodo biochimico di Stanford e Smith ... » 24

II.3. Attività azotofissatrice ... » 26

II.3.1. Determinazione dell'attività azotofissatrice su campioni di terreno ... » 26

II.3.2. Determinazione dell'attività azoto fissatrice effettuata su carote ... » 27

II.3.3. Misura dell'attività azotofissatrice *in situ* con sistema aperto ... » 29

II.3.4. Misura simultanea dell'azotofissazione e della denitrificazione ... » 32

II.4. Attività ammoniossidante ... *Pag.* 33
II.4.1. Misura dell'attività nitrificante potenziale (PNA) ... » 33
II.5. Valutazione dell'attività denitrificante del suolo ... » 34
II.5.1. Valutazione dell'attività denitrificante *in situ* ... » 34
II.5.2. Valutazione della denitrificazione potenziale del suolo D.E.A. ... » 36

III. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ POTENZIALE DELLA BIOMASSA MICROBICA
III.1. Determinazione del potenziale nitrificante ... » 38
III.1.1. Determinazione del potenziale nitrificante del suolo condizionato alla capacità di campo » 38
III.1.2. Misura del potenziale nitrificante sulla sospensione del suolo (a) ... » 39
III.1.3. Misura del potenziale nitrificante sulla sospensione del suolo (b) ... » 40

III.2. Attività ammonificante potenziale ... » 42
III.2.1. Metodo della piastra di terra ... » 42
III.2.2. Metodo della caseina lattica ... » 43
III.2.3. Metodo dell'arginina ... » 44

III.3. Respirazione del suolo indotta dall'aggiunta di substrato (metodo SIR) ... » 45

IV. DETERMINAZIONE DELLE ATTIVITÀ ENZIMATICHE
IV.1. Attività ureasica dei suoli ... » 48
IV.1.1. Determinazione mediante la misura dell'urea non consumata ... » 48
IV.1.2. Determinazione mediante misura dell'ammoniaca prodotta ... » 50

IV.2. Attività proteolitica del suolo ... » 52
IV.2.1. Attività proteasica verso substrati di alto peso molecolare ... » 52
IV.2.2. Determinazione dell'attività proteasica verso un substrato a basso peso molecolare ... » 53

IV.3. Determinazione dell'attività fosfatasica del suolo ... » 56
IV.3.1. Metodo per la determinazione della fosfomonoesterasi ... » 56
IV.3.2. Metodo per la determinazione della fosfodiesterasi ... » 57
IV.3.3. Metodo per la determinazione della pirofosfatasi ... » 58

IV.4. Determinazione dell'attività solfatasica del suolo ... » 60
IV.4.1. Metodo per la determinazione della arilsolfatasi ... » 60

IV.5. Determinazione dell'attività deidrogenasi del suolo ... » 61
IV.5.1. Determinazione dell'attività deidrogenasica con iodo-nitrofenilformazano ... » 61
IV.5.2. Metodo di determinazione dell'attività deidrogenasica semplificato ... » 62

DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETO 23 febbraio 2004.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi biochimica del suolo.

IL MINISTRO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

Vista la legge 15 marzo 1997, n. 59, recante delega del Governo per il conferimento di funzioni e compiti alle regioni ed enti locali, per la riforma della pubblica amministrazione e per la semplificazione amministrativa;

Visto il decreto legislativo 4 giugno 1997, n. 143, recante conferimento alle regioni delle funzioni amministrative in materia di agricoltura e pesca e riorganizzazione dell'Amministrazione centrale;

Visto in particolare l'art. 2, comma 2, della legge predetta, laddove si stabilisce che il Ministero per le politiche agricole svolge, tra l'altro, compiti di disciplina generale e coordinamento nazionale in diverse materie, tra le quali la tutela della qualità dei prodotti agroalimentari, caratteristica dipendente in buona parte dalle condizioni di gestione del suolo e delle acque;

Visto il decreto legislativo 31 marzo 1998, n. 112, recante conferimento di funzioni e compiti amministrativi dello Stato alle regioni e agli enti locali, in attuazione del capo I della citata legge n. 59 del 1996;

Visto il decreto legislativo 30 luglio 1999, n. 300, che riforma l'organizzazione del Governo e definisce le attribuzioni del Ministero per le politiche agricole e forestali;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 28 marzo 2000, n. 450, concernente il regolamento di organizzazione del Ministero delle politiche agricole e forestali;

Visto il decreto ministeriale 15 marzo 2002, n. 31305/1100 che individua gli uffici di livello dirigenziale non generali del Ministero delle politiche agricole e forestali e definisce i relativi compiti;

Visto in particolare l'art. 2, comma 5, del predetto decreto, che nell'ambito del Dipartimento della qualità dei prodotti agroalimentari e dei servizi - Direzione generale per le politiche strutturali e lo sviluppo rurale, istituisce l'Ufficio POSR VII conferendogli specifiche attribuzioni tra cui la ricostituzione dell'Osservatorio nazionale pedologico;

Visto il decreto del Ministro delle politiche agricole e forestali n. 10052 del 25 marzo 2003 con il quale è stato ricostituito il Comitato consultivo tecnico scientifico per l'Osservatorio nazionale pedologico e per la qualità del suolo agricolo e forestale, con compiti di studio e consulenza e proposizione di soluzioni operative per preservare, recuperare ed accrescere la produttività quantitativa e qualitativa dei suoli;

Considerato che tra le linee di attività del predetto comitato è prevista anche la standardizzazione dei metodi di analisi del suolo;

Vista la convenzione delle Nazioni unite per la lotta contro la desertificazione negoziata nel 1994 in seguito alle raccomandazioni della Conferenza delle Nazioni unite tenuta a Rio de Janeiro nel 1992, convenzione che, ratificata dall'Italia con legge 4 giugno 1997, n. 170, riflettendo il capitolo 12 dell'Agenda 21 dedica una diffusa e particolare attenzione alle problematiche di conoscenza, difesa e salvaguardia del suolo e delle acque;

Visto il regolamento (CE) 1257/1999 del Consiglio così come modificato dal regolamento (CE) 1783/2003 sul sostegno comunitario allo sviluppo rurale sostenibile che, in particolare con le misure agroambientali, è inteso a promuovere forme di conduzione dei terreni agricoli compatibili con la tutela e con il miglioramento delle diverse componenti ambientali;

Visti i decreti ministeriali 11 maggio 1992 e 13 settembre 1999, con i quali sono stati approvati, riapprovati e resi ufficiali i metodi di analisi chimica del suolo;

Visto il decreto ministeriale 10 agosto 1997 con il quale sono stati approvati e resi ufficiali i metodi di analisi fisica del suolo;

Visto il decreto ministeriale 23 marzo 2000 di approvazione dei metodi ufficiali di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico;

Visto il decreto ministeriale 8 luglio 2002 di approvazione dei metodi ufficiali di analisi microbiologica del suolo;

Vista la direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 marzo 2001 sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati;

Considerato che per una valida politica nazionale di programmazione dell'uso del suolo e delle acque reflue per uso irriguo va perseguita quell'approfondita conoscenza delle caratteristiche biochimiche del suolo che oggi è del tutto carente nei suoi vari aspetti, e che a tal fine occorre, tra l'altro, meglio definire i metodi di analisi biochimica del suolo, nonché acquisire vantaggiosamente nell'ambito nazionale metodi già definiti in ambito internazionale da istituzioni di normalizzazione come ISO e CEN;

Considerato che l'Istituto sperimentale per la nutrizione delle piante, organismo scientifico specialistico del Ministero per le politiche agricole e forestali, su incarico del Ministero stesso e nell'ambito delle iniziative del Comitato tecnico scientifico per l'Osservatorio nazionale pedologico ha definito gli accennati metodi biochimici di analisi del suolo, giovandosi di diverse collaborazioni esterne, in particolare delle commissioni biologia del suolo e fertilità del suolo e nutrizione delle piante della Società italiana per la scienza del suolo;

Considerato che il comitato tecnico scientifico sopra richiamato, nella riunione del 17 novembre 2003, ha espresso parere positivo sui medesimi metodi;

Ritenuto opportuno approvare e rendere ufficiali i predetti metodi affinché ne venga consentita la più diffusa utilizzazione nel territorio nazionale;

Decreta:

Articolo unico

Al fine di disporre di metodi di conoscenza standardizzati per la definizione delle caratteristiche biochimiche del suolo, utilizzabili per gli scopi indicati nelle premesse, sono approvati e resi ufficiali i metodi di analisi biochimica del suolo di cui all'allegato al presente decreto, che ne costituisce parte integrante.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, 23 febbraio 2004

Il Ministro: ALEMANNO

ALLEGATO

Metodi I.1.

DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA MICROBICA DEL SUOLO PER FUMIGAZIONE

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione della biomassa microbica del suolo.

Metodo I.1.1.

Fumigazione con cloroformio

1. Principio
I metodi che prevedono la fumigazione del terreno con cloroformio si basano sul fatto che i vapori del fumigante provocano la lisi, quindi la morte, delle cellule microbiche con il conseguente rilascio di materiale citoplasmatico.

2 Reattivi
2.1. Cloroformio per cromatografia, cioè stabilizzato con amilene (2-amino-butene);
2.2. grasso al silicone;
2.3. carta bibula.

3. Apparecchiatura
3.1. Camera termostatabile;
3.2. cappa chimica aspirante;
3.3. pompa rotante da vuoto;
3.4. apparecchiatura per la stima della capacità di campo;
3.5. essiccatore da vuoto;
3.6. beakers in vetro da 100 mL;
3.7. palline antiebollizione.

4. Procedimento
4.1. Purificazione del cloroformio stabilizzato con etanolo
Occorre lavorare sotto una cappa aspirante ben funzionante ed avere 2 bottiglie Pirex con tappo a vite da 1 litro. Si introducono 500 mL di $CHCl_3$ in una bottiglia e si aggiungono 25 mL di H_2SO_4 concentrato (96%). Si tappa e agita energicamente per 2-3 minuti; si versa in un imbuto separatore e si attende per qualche secondo la separazione della fase $CHCl_3$ (superiore) dall'acido solforico; quindi si versa il $CHCl_3$ nell'altra bottiglia e si scarta l'acido solforico.
Impiegando ogni volta H_2SO_4 nuovo, si ripete 3 volte il lavaggio del cloroformio. Dopo l'ultima eliminazione dell'acido solforico, si trasferisce il $CHCl_3$ in un beaker di vetro da 2 litri e si aggiunge circa 1 litro di acqua di rubinetto; quindi si mescola bene con una bacchetta di vetro, si attende la separazione delle fasi e si scarta l'acqua. Si ripete 3-4 volte cambiando ogni

volta l'acqua. Quindi si distilla il $CHCl_3$ così lavato, avendo cura che la temperatura non superi mai i 66°C. Infine si raccoglie il distillato in bottiglia di vetro scura, si aggiungono 10 g di K_2CO_3 anidro e si conserva in frigo. A questo punto il $CHCl_3$ può essere usato per fumigare il terreno se appare perfettamente limpido.

4.2. Fumigazione

La fumigazione con cloroformio consiste nel mantenere il campione di suolo in una atmosfera di cloroformio per 20-24 ore, al buio ed a 25°C. Si introduce in un ampio essiccatore un beaker di vetro con 30-40 g di ogni campione di suolo fresco aggiustato al 50% della capacità di ritenzione idrica. Non occorre siglare direttamente i beaker con pennarelli poiché il $CHCl_3$ scioglie la scrittura, ma piuttosto è bene introdurre in ogni beaker un pezzetto di carta bibula siglato a matita. Poggiare quindi tutti i beaker con i suoli sulla piastra di porcellana forata dell'essiccatore (circa 30 cm di diametro), sul cui fondo sia stato già messo un beaker contenente circa 50 mL di $CHCl_3$ per cromatografia, cioè stabilizzato con 2-amino-butene e qualche pallina antiebollizione. Si può anche utilizzare cloroformio stabilizzato con etanolo, purché l'alcool venga previamente eliminato. Sul fondo e ai lati dell'essiccatore è bene sistemare anche qualche striscia di carta bibula imbevuta di acqua in modo da evitare l'abbassamento dell'umidità dei suoli durante la fumigazione. Quindi azionare la pompa rotante da vuoto per creare un'atmosfera di $CHCl_3$ all'interno dell'essiccatore. Una volta che si formano numerose bollicine nel $CHCl_3$, si lascia funzionare la pompa ancora per un minuto. Quindi, chiuso l'essiccatore, si incuba per 20-24 ore al buio e a 25°C. Dopo tale lasso di tempo il $CHCl_3$ deve essere completamente rimosso dai pori del terreno. Per questo occorre aprire l'essiccatore, rimuovere il beaker con il $CHCl_3$ (se la fumigazione è stata condotta bene il livello del $CHCl_3$ dopo le 24 ore si è notevolmente abbassato), riporre i suoli fumigati dentro l'essiccatore; quindi, sempre con la pompa da vuoto, si effettuano 8 successive evacuazioni di 2 minuti ciascuna, intercalate da reimmissioni di aria per 30 secondi.
Il cloroformio deve essere previamente purificato dalle sostanze stabilizzanti (di solito etanolo) con cui le ditte produttrici lo immettono sul mercato, poiché diversamente i risultati vengono largamente sovrastimati.

Metodo I.1.2.

Determinazione del contenuto di carbonio della biomassa microbica (B_C) col metodo Fumigazione-Incubazione (FI)

1. Principio

Nel metodo della Fumigazione-Incubazione (FI), i residui delle cellule uccise dal cloroformio vengono mineralizzati a CO_2 e NH_4^+, durante un'incubazione di 10 giorni a 25°C, dai microrganismi sopravvissuti alla fumigazione od inoculati nel terreno dopo l'eliminazione del cloroformio. Come controllo si usa il terreno non fumigato con determinazione di CO_2 e NH_4^+ prodotti durante un'incubazione alle stesse condizioni sopra riportate. Il limite maggiore di questo metodo è la scelta del controllo e del relativo periodo d'incubazione. Non è possibile, comunque, applicare il metodo FI nel caso di terreni acidi, sommersi o di recente ammendati con substrato organico fresco. La dimensione del flusso di decomposizione può essere messa in relazione diretta col contenuto in carbonio della biomassa del suolo all'inizio della fumigazione tramite l'equazione

$$B_C = F_C/K_C$$

dove B_C è il contenuto di carbonio della biomassa microbica in μg C g^{-1} suolo secco, F_C è la quantità di C prodotta come CO_2 durante l'incubazione del suolo fumigato sottratte della quantità derivante dal suolo non fumigato (controllo) e incubato alle stesse condizioni del precedente, K_C (in genere è uguale a 0,45) è la frazione di carbonio proveniente dalla biomassa uccisa che viene mineralizzata a CO_2 durante l'incubazione in condizioni standard.

2. Reattivi

2.1. Soluzione di indicatore acido-base: sciogliere 100 mg di fenolftaleina in 100 mL di etanolo all'80%;

2.2. soluzione di bario cloruro 0,75 N: introdurre 91,61 g di $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ in un pallone da 1000 mL, sciogliere con circa 700 mL di H_2O deionizzata e quindi portare a volume con acqua;

2.3. soluzione di idrossido di sodio 1N: diluire una soluzione volumetrica contenente 1 mole di NaOH fino a 1000 mL con acqua deionizzata;

2.4. soluzione titolante di acido cloridrico 0,1 N: diluire una soluzione volumetrica contenente 0,1 moli di HCl fino a 1000 mL con acqua deionizzata.

3. Apparecchiatura

3.1. Camera termostatabile;

3.2. titolatore automatico (se possibile);

3.3. fiasche di vetro ermetiche di circa 1000 mL di capacità;

3.4. buretta a caricamento automatico (divisione 1/20 mL);

3.5. beakers da 250 mL, ancorette magnetiche, piastra agitante, tavolo elevatore.

4. Procedimento

Sia il beaker contenente il suolo fumigato che quello con il suolo di controllo vengono messi singolarmente in fiasche da 1000 mL a chiusura ermetica, assieme a 2 beakers più piccoli, uno di plastica contenente 4 mL di NaOH 1N (soluzione che assorbirà la CO_2) e l'altro di vetro con 4 mL di acqua (per impedire l'abbassamento di umidità durante l'incubazione). Si chiudono tutte le fiasche e si incubano in una camera termostata a 25°C. Inoltre si incubano anche 2 fiasche che non contengano il suolo (prova in bianco). Esse serviranno a valutare la CO_2 non prodotta dal suolo ed assorbita dalla soda durante le varie fasi della titolazione. Dopo 10 giorni di incubazione si riaprono le fiasche e si aggiungono 8 mL di $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,75N nei beakers contenenti la soda (si forma un precipitato lattiginoso di $BaCO_3$); quindi si tappano immediatamente con parafilm. E' necessario, in ogni fase della determinazione, non respirare al di sopra dei beaker. Quindi si procede alla titolazione della soda residua con HCl 0,1N. Se si dispone di un titolatore automatico, il pH di fine titolazione è 8,62. Altrimenti si devono aggiungere 2-3 gocce dell'indicatore acido-base (dopo l'aggiunta dell'indicatore, la soluzione basica diventa di colore rosa ed il punto di viraggio è dato dalla scomparsa del colore rosa, cioè la soluzione ridiventa lattiginosa).

5. Espressione dei risultati

Poiché la produzione di CO_2 è stata evidenziata per assorbimento su NaOH secondo la reazione

$$CO_2 + 2OH^- \Rightarrow CO_3^{2-} + H_2O$$

la quantità di C della CO_2 viene così calcolata:

μg CO_2-C g^{-1} suolo umido = (**b-a**) · 0,1 · 6 · 1000/peso suolo umido (g),

dove:
b è il volume (mL) di HCl 0,1N usato per titolare il bianco; **a** il volume (mL) di HCl 0,1N per titolare le prove col suolo; 0,1 la normalità del titolante; 6 il peso equivalente del carbonio (peso atomico diviso il numero di ossidrili con cui reagisce la CO_2); 1000 il fattore di conversione da mg a µg.
Il contenuto in carbonio della biomassa microbica (B_C) viene calcolato come riportato in precedenza ($B_C = F_C / K_C$). Naturalmente occorre considerare la quantità di suolo secco.

6. Note
Il problema maggiore del metodo FI è la scelta del controllo. Esso è indispensabile poiché non tutta la CO_2 evoluta dal suolo fumigato durante l'incubazione deriva dalla decomposizione dei microorganismi lisati dal $CHCl_3$; una aliquota di essa è infatti ascrivibile alla respirazione basale (degradazione di substrati organici extracellulari).
Il metodo FI per la misura di B_C non è applicabile ai suoli acidi, a quelli sommersi e a quelli che abbiano ricevuto di recente un substrato organico fresco, in quanto si è visto che in tali condizioni molto spesso la CO_2 prodotta dal controllo risulta essere superiore quantitativamente rispetto alla CO_2 prodotta dal suolo fumigato, dando così origine a valori di B_C negativi. Si consiglia, prima della fumigazione già descritta, di pre-incubare a temperatura ambiente i suoli per 7 giorni in presenza di alcali (NaOH+CaO), affinché si esaurisca la CO_2 derivante dalla respirazione di frammenti di radice ancora viventi o da processi abiotici nel caso di suoli calcarei.

Metodo I.1.3.

Determinazione dell'azoto della biomassa microbica (B_N) col metodo Fumigazione-Incubazione (FI)

1. Principio
Il metodo si basa sulla mineralizzazione ad azoto ammoniacale delle forme organiche azotate contenute nelle cellule microbiche lisate dal cloroformio, ad opera dei microrganismi sopravvissuti alla fumigazione od in oculati nel suolo fumigato. Si può quindi determinare il contenuto in azoto della biomassa microbica tramite la relazione

$$B_N = F_N / K_N$$

Dove:
F_N è il flusso addizionale di N ammoniacale prodotto durante l'incubazione che segue la fumigazione con cloroformio; K_N è la frazione di N contenuto nella biomassa uccisa che viene mineralizzata sotto le particolari condizioni di incubazione usate. Quindi, F_N risulta essere la differenza tra N mineralizzato dal suolo fumigato e incubato e l'N mineralizzato dal suolo non fumigato (controllo) e incubato alle stesse condizioni.

2. Reattivi
2.1. magnesio ossido (MgO). Scaldare circa 200 g di MgO "pesante" in fornace a 600-700°C per 2 ore. Raffreddare il prodotto in un essiccatore contenente granuli di KOH e conservarlo in una bottiglia ben tappata;
2.2. soluzione estraente (potassio cloruro 1N). Introdurre 74,56 g di KCl in un pallone da 1 L, sciogliere con circa 700 mL di acqua deionizzata e portare a volume con acqua;

2.3. soluzione di acido borico-indicatore. Sciogliere 20 g di H_3BO_3 puro in circa 700 mL di acqua calda, trasferire la soluzione raffreddata in un pallone da 1000 mL già contenente 200 mL di etanolo e 20 mL di una miscela di indicatori preparata sciogliendo 0,3 g di verde bromocresolo e 0,165 g di rosso metile in 500 mL di etanolo. Dopo aver miscelato (a questo punto la soluzione appare rosa), aggiungere NaOH 0,05 N fino a comparsa del colore verde pallido. Quindi portare a volume con acqua deionizzata (Keeney e Nelson, 1982);

2.4. soluzione titolante di acido solforico 0,005 N. Preparare diluendo fino a 2 L una soluzione volumetrica contenente 0,005 moli di H_2SO_4.

3. Apparecchiatura

3.1. Agitatore a scuotimento lineare alternato;
3.2. distillatore micro-Kjeldahl;
3.3. titolatore automatico (se possibile);
3.4. spettrofotometro (se possibile);
3.5. contenitori di plastica da 250 mL con tappo avvitabile;
3.6. imbuti, filtri di carta Whatman 42 e contenitori di plastica da 100 mL con tappo.

4. Procedimento

I campioni di suolo, sia fumigati che non, ed incubati per 10 giorni a 25°C, utilizzati per la determinazione di B_C (la CO_2 prodotta durante l'incubazione è stata assorbita dalla soda, i suoli quindi non sono stati distrutti), vengono estratti (agitazione per 60 minuti a velocità media e a temperatura ambiente) con una soluzione di KCl 1N nel rapporto suolo (g):estraente (mL) 1:4. Il suolo (30 g), fumigato e non, viene trasferito dai beaker in contenitori da 250 mL e trattato con 120 mL di KCl 1N, quindi i contenitori vengono tappati ed agitati. Dopo estrazione le sospensioni di suolo vengono filtrate per mezzo di imbuti contenenti dischi di carta Whatman 42, ed il filtrato viene raccolto in contenitori tappabili di plastica.
Il contenuto in azoto ammoniacale del filtrato può essere determinato mediante diversi metodi: 1) distillazione dell'estratto in corrente di vapore, in presenza di MgO, con un apparato micro-Kjeldahl e successive distillazione e titolazione; 2) con una delle reazioni colorimetriche tipiche dell'ammonio (indofenolo, Nessler, ecc.).

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di azoto ammoniacale in ogni suolo, fumigato e non, viene calcolato come segue:

$$\mu g\ NH_4^+\text{-}N\ g^{-1}\ \text{suolo umido} = V \cdot 0{,}005 \cdot 14 \cdot 1000/\mathbf{b}$$

dove:
V è il volume (mL) di H_2SO_4 usato per la titolazione, 0,005 è la normalità del titolante, 14 il peso equivalente dell'azoto, 1000 il fattore di conversione da mg a µg, **b** i grammi di suolo umido corrispondenti al volume di estratto in base al rapporto di estrazione usato. Così, se sono stati usati 25 mL di estratto, in base al rapporto di estrazione 1:4 (g:mL), **b** sarà uguale a 6,25.
Il flusso di mineralizzazione dell'azoto dopo fumigazione, F_N, sarà uguale alla differenza tra NH_4^+-N scambiabile presente nel fumigato dopo 10 giorni d'incubazione meno il corrispettivo accumulato nel non fumigato (controllo). Assumendo K_N = 0,54, ne consegue la relazione:

$$B_N = F_N / 0{,}54$$

Analogamente a B_C, i dati così ottenuti devono essere riportati a g^{-1} suolo secco.

Metodo I.1.4.

Determinazione di B_N e B_C col metodo Fumigazione-Estrazione (FE)

1. Principio

Il metodo della fumigazione-estrazione si basa sul fatto che i composti cellulari rilasciati in seguito alla lisi cellulare, indotta dalla fumigazione, possono essere estratti da una soluzione salina. Si è accertato che esiste una stretta correlazione fra il contenuto in C della biomassa misurato col metodo FI (B_C) e il contenuto di C estratto con K_2SO_4 0,5 M dopo fumigazione, secondo l'equazione:

$$B_C = 2{,}64 \cdot E_C$$

dove:

E_C è la differenza fra il C organico estratto dal suolo fumigato e quello estratto dal suolo non fumigato (controllo).

Inoltre è stata osservata una correlazione lineare molto significativa tra l'azoto totale estratto con una soluzione salina, dopo fumigazione con $CHCl_3$, e l'F_N valutato secondo il metodo FI. Da questa correlazione si è potuta ricavare la relazione

$$B_N = 2{,}22 \cdot E_N$$

dove B_N è il contenuto in N della biomassa microbica; E_N è l'azoto totale estratto con K_2SO_4 0.5 M dal suolo fumigato meno quello estratto dal suolo non fumigato (controllo); 2,22 è un fattore di proporzionalità empiricamente determinato e basato su una stima di B_N ottenuta ponendo K_N uguale a 0,57. Assumendo, invece, un valore di K_N di 0,68 il fattore di proporzionalità diventa 1,85.

2. Reattivi

2.1. Soluzione estraente (dipotassio solfato 0,5 M). Introdurre 87,13 g di K_2SO_4 in un pallone da 1000 mL, sciogliere con circa 700 mL di acqua deionizzata e portare a volume con acqua;

2.2. acido solforico al 3% e al 96%;

2.3. soluzione di rame solfato 0,29 M. Introdurre 4,63 g di $CuSO_4$ in un pallone da 100 mL, sciogliere con circa 70 mL di acqua deionizzata e portare a volume con acqua;

2.4. sodio idrossido 9 N. Introdurre 360 g di NaOH a scaglie in un beaker di plastica da 1000 mL, sciogliere con circa 700 mL di acqua deionizzata (porre il beaker in acqua fredda per facilitare il raffreddamento della soluzione) e portare a volume con acqua;

2.5. soluzione di acido borico-indicatore. Preparare come in 1.3.3.3;

2.6. soluzione titolante di acido solforico 0,005 N. Preparare come in 1.3.3.3;

2.7. acido fosforico 85%;

2.8. ossido di mercurio (HgO);

2.9. dicromato di potassio 0.4 N. Sciogliere 19,613 g di $K_2Cr_2O_7$ (essiccato a 105°C) in 200 mL di acqua deionizzata e portare a 1 litro con acqua. Conservare a temperatura ambiente; il titolo è molto stabile;

2.10. soluzione titolante di sale di Mohr 33,3 mN. In un pallone da 1000 mL introdurre 13,06 g di $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ e 50 mL di H_2SO_4 96%; dopo che il sale è sciolto, portare a volume con acqua deionizzata. A causa della lenta ossidazione dello ione ferroso a ferrico, tale soluzione deve essere titolata al momento dell'uso con dicromato;

2.11. soluzione indicatore redox (complesso 1,10-fenantrolina-$FeSO_4$ 25 mM). Sciogliere 1,485 g di 1,10-fenantrolina monoidrata e 0,695 g di $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ in 100 mL di acqua deionizzata.

3. Apparecchiatura

3.1. Agitatore a scuotimento lineare alternato;
3.2. titolatore automatico (se possibile);
3.3. bagnomaria con agitazione;
3.4. distillatore micro-Kjeldahl;
3.5. contenitori di plastica da 250 mL, palloni in vetro da 100 mL, parafilm, carta stagnola, palline antiebollizione di vetro;
3.6. imbuti, filtri di carta Whatman 42 e contenitori da 100 mL di plastica con tappo.

4. Procedimento

I campioni di suolo, fumigati e non, preparati come per il metodo FI, non devono essere incubati ma immediatamente estratti con K_2SO_4 0,5 M nel rapporto suolo (g):estraente (mL) 1:4 per 30 minuti a temperatura ambiente ed agitazione media, e quindi filtrati con carta Whatman 42. Gli estratti così ottenuti possono essere analizzati per il contenuto di C organico, N totale e di altri elementi. Da notare che anche col metodo FE è consigliato di portare i suoli al 50% della capacità di ritenzione idrica prima della fumigazione.

4.1. *Determinazione del contenuto in N della biomassa microbica*

Per determinare il contenuto in N della biomassa microbica occorre analizzare il contenuto in N totale degli estratti. Operando sotto cappa aspirante, 20 mL di estratto vengono introdotti in tubi da digestione da 75 mL (è indispensabile mantenere tali tubi nell'idoneo supporto metallico per evitare un riscaldamento disomogeneo durante la successiva fase di digestione); quindi si aggiungono per ogni tubo 4 mL di H_2SO_4 al 96%, 0,5 mL di $CuSO_4$ 0,29 M e qualche pallina antiebollizione di vetro. Quindi i tubi vengono trasferiti, tramite supporto metallico, in un digestore monoblocco di alluminio e, al fine di eliminare l'eccesso di acqua, condurre due pre-digestioni, una di 2 ore a 120°C e l'altra di un'ora a 180°C. Quindi si opera una digestione finale a 360°C per 3 ore. Il numero e la durata delle pre-digestioni può variare in funzione del tipo di digestore usato. Naturalmente durante la digestione a caldo, i tubi devono essere collegati con un sistema di aspirazione per la condensazione dei fumi acidi. Se si dispone di un titolatore automatico, si digerisce anche un bianco che differisce dai campioni solo poiché l'estratto di suolo è sostituito con un volume uguale di soluzione estraente (20 mL K_2SO_4 0,5 M). Finita la digestione, si lascia raffreddare, si aggiungono ad ogni tubo 15 mL di acqua deionizzata, si scuotono i tubi con il Vortex per staccare l'eventuale sedimento minerale attaccato sul fondo, e quindi si porta a volume (75 mL) con acqua deionizzata. Si tappano i tubi con Parafilm e si miscela energicamente. Quindi, con un apparato micro-Kjeldahl distillare 25 mL del surnatante limpido dei 75 mL contenuti in ogni tubo, aggiungendo 8 mL di NaOH 9 N. Naturalmente, per non far volatilizzare NH_3, la soda deve essere aggiunta attraverso l'imbuto raccoglitore dopo che il pallone di distillazione è stato ben avvitato. Per gli

accorgimenti durante la distillazione, la raccolta del distillato e la titolazione, seguire la procedura adottata col metodo FI per la determinazione dell'azoto ammoniacale. Al solito, disponendo di un titolatore automatico, il punto di fine titolazione sarà il pH della soluzione di raccolta del distillato del bianco (di solito circa 5,4).

4.2. *Espressione dei risultati*

Il contenuto in N totale estratto da ogni suolo, prima e dopo fumigazione, sarà:

$$\mu g\ N\ g^{-1}\ \text{suolo umido} = V \cdot 0{,}005 \cdot 14 \cdot 3 \cdot 1000/5$$

dove:
V è il volume (in mL) di H_2SO_4 usato per la titolazione, 0,005 la normalità del titolante, 14 il peso equivalente dell'azoto, 3 rapporta i 25 mL distillati ai 75 totali del tubo da digestione, 1000 converte i mg a µg e 5 sono i grammi di suolo umido corrispondenti a 20 mL di estratto usati per la digestione, in base al rapporto di estrazione usato.
Il flusso addizionale di N totale estraibile indotto dalla fumigazione, E_N, è uguale alla differenza in $\mu g\ N\ g^{-1}$ suolo tra suolo fumigato e non (controllo).

4.3. *Determinazione del contenuto in C della biomassa microbica*

Al fine di stimare il contenuto in C della biomassa microbica occorre determinare il contenuto in C organico degli estratti di suolo, sia fumigato che non fumigato. Tale determinazione si effettua per ossidazione in ambiente acido a caldo. Si introducono 8 mL di estratto, 2 mL di $K_2Cr_2O_7$ 0,4 N, 70 mg di HgO (evita la formazione di composti in grado di interferire col tipo di determinazione), 10 mL H_2SO_4 al 96% e 5 mL H_3PO_4 all'85% in palloncini da 100 mL. Si prepara anche un bianco che invece dell'estratto di suolo contiene la soluzione estraente (8 mL K_2SO_4 0,5 M). Quindi si tappa con carta stagnola e si mantengono i palloni a 160°C per 30 minuti, preferibilmente sotto blanda agitazione. Dopo raffreddamento si porta a volume con acqua deionizzata, si agita finché la soluzione diventa omogenea, e si titola il dicromato che non ha reagito con $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ (sale di Mohr) 33,3 mN in ambiente acido, usando come indicatore redox il complesso 1,10-fenantrolina-$FeSO_4$ 25 mM. Più precisamente, in un beaker da 250 mL si introducono 25 mL dei 100 mL di ogni pallone, 50 mL di H_2SO_4 al 3% e 2-3 gocce di indicatore. Quindi, sotto agitazione si aggiunge goccia a goccia il titolante. Il punto di fine titolazione è dato dal viraggio della soluzione da arancione a rosa-rosso (bastano poche gocce affinché la miscela di titolazione, dopo aver raggiunto una colorazione incolore-azzurro pallido, passi ad una rosa-rosso).

4.4. *Espressione dei risultati*

Poiché il C organico viene ossidato dal dicromato secondo la reazione

$$2Cr_2O_7^{2-} + 3C + 16H^+ \Rightarrow 4Cr^{3+} + 3CO_2 + 8H_2O$$

il contenuto in C organico di ogni estratto si ricava dalla seguente relazione:

$$\mu g\ C\ g^{-1}\ \text{suolo umido} = (\mathbf{b - a}) \cdot 0{,}0333 \cdot 3 \cdot 4 \cdot 1000/2$$

dove:
b è il volume di titolante (mL) necessario a titolare il bianco; **a** il volume di titolante (mL) usato per il campione; 0,0333 la normalità del sale di Mohr; 3 il peso equivalente del C; 4 rapporta i 25 mL titolati ai 100 totali nel pallone; 1000 converte i mg a µg; 2 sono i grammi di suolo corrispondenti a 8 mL di estratto, in base al rapporto di estrazione usato.
Il flusso addizionale di C organico totale estraibile causato dalla fumigazione, E_C, è uguale alla differenza in µg C g^{-1} suolo tra suolo fumigato e non (controllo).

4.5. *Determinazione del contenuto di zolfo della biomassa microbica (B_S) con il metodo Fumigazione-Estrazione (FE)*
E' possibile estrarre i composti organici dello zolfo dal terreno, fumigato e non, con $NaHCO_3$ 0,1M o $CaCl_2$ 10 mM nel rapporto suolo (g)/estraente (mL) 1:5.

4.6. *Espressione dei risultati*
Il valore di B_S può essere stimato, se si usa il $NaHCO_3$ come estraente, dalla seguente relazione:

$$B_S = F_S/K_S$$

dove B_S sono i µg di S della biomassa g^{-1} suolo, F_S sono i µg di S totale estratti dal suolo fumigato sottratti di quelli estratti dal suolo non fumigato (controllo) e K_S è la proporzione di S-biomassa aggiunto, rilasciato con la fumigazione e quindi estratto. Usando come estraente il $CaCl_2$, il valore di K_S è 0,412.
Analogamente alla determinazione di B_C e B_N, la stima del contenuto di B_S si riduce alla valutazione del flusso addizionale di S totale causato dalla fumigazione.

4.7. *Determinazione del fosforo contenuto nella biomassa microbica (B_P) col metodo Fumigazione-Estrazione (FE)*
Anche in questo caso si procede all'estrazione del terreno fumigato e non. Si determina quindi il flusso addizionale (F_P) di fosforo inorganico (P_i) causato dalla fumigazione con $CHCl_3$ per 24 ore. Il valore di F_P è dato dal P_i rilasciato dal suolo fumigato sottratto del P_i rilasciato dal suolo non fumigato.
Si predispongono 3 coppie di aliquote di 10 grammi di suolo; si fumiga la prima coppia per 24 ore a 25°C, e si incubano aerobicamente a 25°C per 24 ore, la seconda e terza coppia. Quindi estrarre le prime due coppie di suoli con 200 mL di $NaHCO_3$ 0,5 M (pH 8,5) e la terza con 200 mL della stessa soluzione addizionata di 250 µg di P_i.

4.8. *Espressione dei risultati*
Il contenuto in P della biomassa microbica si ricava dalla relazione:

$$B_P = \mu g\ P_i\ g^{-1}\ suolo = [25 \cdot (\mathbf{b}-\mathbf{a})] / [0,4 \cdot (\mathbf{c}-\mathbf{a})]$$

dove **a** sono i µg P_i g^{-1} suolo estratti dal suolo non fumigato, **b** i µg P_i g^{-1} suolo estratti dal suolo fumigato (seconda e prima coppia di suoli, rispettivamente), **c** sono i µg P_i g^{-1} suolo estratti dalla terza coppia di suoli.
Il contenuto in P_i di ogni estratto di suolo può essere determinato colorimetricamente dopo aggiunta di ammonio molibdato e acido ascorbico.

Metodo I.2.

DETERMINAZIONE DELL'ATP ESTRATTO CON ACIDO FOSFORICO

1. Oggetto

Il presente documento fissa un mtodo per la determinazione dell'ATP estratto dal suolo.

2. Principio

Il contenuto di ATP (adenosina 5'-trifosfato) nel suolo può essere utilizzato come un indice della biomassa microbica o come indice della attività microbiologica presente. Se il campione di suolo fresco viene analizzato subito dopo il prelievo, il contenuto di ATP rappresenta un indice dell'attività microbica. Se invece il campione di suolo fresco viene preincubato per 5-7 giorni a 25°C ad umidità costante prima di essere analizzato, il contenuto di ATP rappresenta il contenuto di biomassa microbica.

3. Reattivi

3.1. Estraente: Soluzione A (Es A) - 0.67 M H_3PO_4, 2M urea, 20% (in volume) DMSO, 0.02% (in peso) adenosina, 20 mM EDTA (sale bisodico); Soluzione B (Es B) - Differisce dalla soluzione A poiché viene aggiunto, a quest'ultima, ATP (in quantità tale da raggiungere un contenuto di 5-10 ng nella cuvetta di misurazione dell'ATP) come "spike" (standard interno).

3.2. Tampone: Tris 0.2 M, EDTA 4mM ed acetato di Mg 15 mM portato a pH 10.2 - 10.8 con NaOH 1 M; il pH finale del tampone dipende dalla quantità di soluzione estraente impiegata per la determinazione dell'ATP dovendo il valore di pH della soluzione impiegata nel luminometro oscillare tra 7.3 e 7.8.

3.3. Sistema enzimatico luciferina/luciferasi (Monitor Reagent, BioOrbit, Turku Finland).

3.4. ATP standard interno (ATP Standard, BioOrbit, Turku Finland).

4. Apparecchiatura

4.1. Luminometro e cuvette;

4.2. beakers (50 mL);

4.3. sistema di agitazione a temperatura determinata;

4.4. ultrasonicatore con frequenza massima di 20 KHz;

4.5. bagno di ghiaccio.

5. Procedimento

5.1. *Estrazione dell'ATP dal suolo*

I campioni di suolo vengono setacciati immediatamente dopo il prelievo e pesati (1-2 g) nei beakers di analisi. Si aggiunge l'estraente (1:20, rapporto suolo: estraente) ed il miscuglio viene omogeneizzato su agitatore magnetico e sonicato per 2.5 minuti al 60% della frequenza massima esercitata dalla sonda di medio formato di un sonicatore. Il beaker durante tali operazioni è tenuto in bagno di ghiaccio. Dopo averlo chiuso con parafilm, il beaker, contenente la soluzione del suolo, viene posto in bagno a 4°C ed agitato a 150 colpi min^{-1} per 30 minuti; quindi, la mistura viene filtrata su filtro a pieghe (Whatman 42). L'estratto (da 0.01 a 0.15 mL) viene diluito a 0.8 mL con tampone Tris-EDTA-Mg acetato sino ad avere un pH finale di 7.3 - 7.8. Lo stesso procedimento viene seguito impiegando lo stesso suolo ma con la soluzione estraente B per quantificare l'efficienza di estrazione.

5.2. *Determinazione dell'ATP*
Una aliquota (0.2 mL) di Monitor Reagent viene aggiunta all'estratto tamponato (0.8 mL), fresco o conservato a -15°C, in una provetta di polietilene e quindi il tutto leggermente agitato. Si consiglia di effettuare la lettura su tre ripetizioni per ciascun estratto tamponato di suolo e la luce emessa da ogni campione viene misurata per mezzo di un Luminometro 1250 (LKB-WALLAC, Finland) con letture integrate, da tre a sei, (periodo di integrazione 10 secondi). Dopo ciascuna determinazione si aggiunge alla stessa provetta una aliquota nota di ATP (p. es.: 50.7 ng) quale standard interno per correggere l'influenza dell'estratto sull'emissione di luce.

6. Espressione dei risultati
Il contenuto di ATP del terreno viene prima quantificato attraverso il procedimento dello standard interno e poi, considerando l'efficienza di estrazione, ricalcolato secondo quest'ultima grandezza.
Per cui

$$\mathbf{ATP} = \frac{\mathbf{b - a}}{\mathbf{c}} \times \mathbf{d}$$

dove:
a= valore del bianco (estratto tamponato);
b= valore del campione (dopo l'aggiunta del monitor reagent);
c= valore misurato dopo l'aggiunta dello standard interno (diminuito del valore b);
d= quantità di ATP standard aggiunto.

$$\text{Efficienza di estrazione dell'ATP} = \frac{(\text{ATP con Es B}) - (\text{ATP con Es A})}{\text{ATP aggiunto in Es B}}$$

Metodi II.1.

DETERMINAZIONE DELLA RESPIRAZIONE DEL SUOLO

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione della respirazione del suolo

Metodo II.1.1.

Determinazione della CO_2 sviluppata dalla biomassa microbica del suolo per metodo titrimetrico

1. Principio
Durante l'incubazione del suolo all'interno di un sistema chiuso, la CO_2 evoluta viene intrappolata da una soluzione di NaOH e successivamente titolata con HCl.

2. Reattivi

2.1.H_2O distillata (CO_2-free);
2.2.NaOH 1 N;
2.3.HCl 0.1 N;
2.4.$BaCl_2$ 0.75 N;
2.5.indicatore fenolftaleina (sol. all'1% in etanolo 95% v/v) se non si dispone di un titolatore automatico.

3. Apparecchiatura

3.1.Recipienti in vetro con tappo a vite a chiusura ermetica da 1L;
3.2.termostato settato a 25°C;
3.3.titolatore automatico e materiale di corredo o buretta in vetro con rubinetto per titolazione;
3.4.beakers in vetro da 50 mL;
3.5.recipienti in plastica da 50 mL circa.

4. Procedimento

Si pesano 20 g di suolo setacciato (al 55% WHC) in un beaker e si posiziona il beaker sul fondo della fiasca. Si pipettano 4 mL di NaOH 1 N nel recipiente di plastica che viene riposto nell'interno della fiasca adiacente al beaker con il suolo. Si chiude immediatamente il tappo a vite e si accerta che la fiasca sia chiusa ermeticamente.

Si preparano 3-5 controlli costituiti dalle fiasche chiuse ermeticamente con all'interno il recipiente con 4 mL di NaOH senza il beaker contenente il suolo.
Si incubano tutte le fiasche a 25°C per un periodo massimo di 3 giorni (un periodo più lungo potrebbe creare una condizione di anaerobiosi).

Al termine dell'incubazione si aprono le fiasche, si preleva il recipiente con NaOH, si aggiungono 8 mL di $BaCl_2$ 0.75 N e tre o quattro gocce dell'indicatore fenolftaleina. Si titola il contenuto del recipiente con HCl 0.1 N fino al viraggio dal colore rosa al bianco neutro. Se si dispone di un titolatore automatico si imposta un pH di fine titolazione pari a 8.8. Infatti, a questo valore di pH la solubilità del $BaCO_3$ equivale a $4{,}88 \cdot 10^{-4}$; valori di pH minori porterebbero a solubilizzare quantità apprezzabili di $BaCO_3$ e quindi una parte dell'HCl consumato sarebbe da ascrivere alla titolazione del CO_3^{2-}.

5. Espressione dei risultati

La quantità di C-CO_2 prodotta è calcolata secondo la seguente equazione:

$$\text{mg C-CO}_2\ \text{g s.s.}^{-1}\ \text{h}^{-1} = \frac{(\text{Vo-V}) \times \text{M} \times \text{E}}{20 \times \text{h inc}}$$

dove :
g s.s.= grammi di suolo (peso secco)
Vo = mL di HCl necessari per titolare NaOH del controllo (media di tutti i controlli)
V = mL di HCl necessari per titolare NaOH del campione
h inc = durata incubazione espressa in ore
M = 0,1 - Molarità del titolante HCl
E = Peso equivalente del carbonio nella CO_2. E=6 se i risultati vengono espressi in termini di C (ad es. mg di C-CO_2); E=22 se i risultati vengono espressi in termini di CO_2 (ad es. mg di CO_2).

Metodo II.1.2.

Determinazione della respirazione del suolo nel SAPROMAT

1. Principio

Questa stima è basata sulla misura dell'O_2 assorbito durante l'incubazione del suolo in un sistema chiuso. L'O_2 é rilasciato da un sistema elettrochimico.

2. Procedura

L'apparato Sapromat tipo B_6 o B_{12}, consiste in un bagno ad acqua a temperatura regolabile contenente gli strumenti di misura e un sistema di registrazione dei risultati. Il sistema di misura é costituito da un recipiente contenente una soluzione (NaOH) che assorbe la CO_2, un sistema che produce O_2 e un misuratore di pressione. I recipienti sono collegati con tubi di gomma a formare un circuito chiuso per cui i cambiamenti della pressione atmosferica al di fuori del sistema non influenzano le misure di assorbimento dell'O_2.
L'assorbimento di O_2 durante la respirazione del suolo causa una diminuzione di pressione indicato da un misuratore che regola la produzione elettrolitica di ossigeno come anche la visualizzazione e la registrazione dei risultati.

3. Espressione dei risultati

L'assorbimento di O_2 viene visualizzato sul display in mg di O_2.

4. Note

Si consiglia di usare 50-100 g di suolo incubati a temperature che vanno da 20°C a 30°C e al 55% della WHC (Capacità di ritenzione idrica). L'assorbimento di O_2 non viene registrato nelle prime 2 ore al fine di consentire al sistema di equilibrarsi.
Il rapporto CO_2/O_2 della fase gassosa sopra il campione di suolo deve rimanere costante per tutto il periodo di misurazione. In questo modo vengono evitate le condizioni di anaerobiosi.

Metodo II.1.3.

Stima della respirazione del suolo con l'apparato WŒSTHOFF

1. Principio

Il metodo si basa sulla determinazione della CO_2 con l'analizzatore Wœsthoff Ultragas 3.

2. Procedimento

I tubi per i campioni sono riempiti con suolo umido e setacciato (100g al 55% della WHC) e si incuba a 22°C (Anderson and Domsch 1978b). Ad intervalli di 1 ora viene insufflata aria senza CO_2 attraverso il suolo e la concentrazione di CO_2 viene misurata per 10 minuti.

3. Espressione dei risultati
L'analizzatore di gas Ultragas 3 misura variazioni di conducibilità elettrolitica (diminuzione) causate dalla reazione della CO_2 con la soluzione acquosa di NaOH presente in un recipiente all'interno dell'analizzatore. Queste variazioni sono proporzionali alla concentrazione di CO_2 e si possono registrare i risultati ottenuti.

4. Note
La versione più moderna dell'Ultragas US4-CO_2 é caratterizzata da una alta sensibilità e pertanto é consigliabile operare a basse concentrazioni di CO_2. Concentrazioni anche inferiori ad 1 ppm di CO_2 possono essere facilmente determinate su di una scala da 0 a 50 ppm.

Metodo II.1.4.

Analisi del gas evoluti dalla biomassa microbica del suolo mediante la tecnica a infrarossi

1. Principio
Il metodo si basa sulla stima automatica della CO_2 attraverso un analizzatore di gas infrarosso (IRGA). I campioni di suolo sono insufflati con aria così che problemi di diffusione e accumulo di CO_2 possono essere evitati.

2. Procedimento
Un sistema di entrata dell'aria realizzato in tubi di PVC (32 mm) é installato a 12 m da terra (o comunque a 1 m al di sopra del tetto) per assicurare un apporto continuo di aria pulita esterna e con concentrazione stabile. Il sistema é formato da 24 linee di campionamento, indipendenti le une dalle altre, in modo da poter variare il flusso in ciascuna da 100 a 1000 mL min^{-1}. Ogni circuito contiene una pompa per gas a membrana, una bottiglia di lavaggio per gas da 500 mL con acqua deionizzata acidificata che funziona da umidificatore e un tubo (25x4cm) di campionamento di perspex nel quale è posto il campione di suolo. Il tubo è chiuso ai lati da cuscinetti di polistirene e collegato al sistema da raccordi in gomma.
Valvole a spillo sono regolate individualmente per impostare lo stesso flusso sulla linea del campione indipendentemente se sia o no diretto all'IRGA.

3. Espressione dei risultati
Un flussimetro misura la velocità di flusso del gas e un IRGA viene usato per misurare le concentrazioni di CO_2 (Heinemeyer et al.1989). L'intero sistema é computerizzato e un tubo senza suolo viene usato come controllo. I quantitativi di suolo utilizzati sono generalmente di 100g al 55% della WHC e tutto il sistema é mantenuto a 22°C.

4. Note
La linearità nell'evoluzione di CO_2 è assicurata per quantità di suolo da 5 a 100 g. Si possono usare anche diverse temperature d'incubazione.
Questo sistema risulta essere molto più sensibile del Sapromat e gode di una buona riproducibilità.

Metodi II.2.

DETERMINAZIONE DEL POTERE MINERALIZZANTE DEL SUOLO

1. Oggetto
Tale documento fissa i metodi per la determinazione del potere mineralizzante del suolo.

Metodo II.2.1.

Metodo di estrazione con acqua bollente

1. Principio
Questo metodo consente l'estrazione dell'azoto presente nel suolo e la sua determinazione quantitativa utilizzando la procedura Kjeldahl.

2. Reattivi
2.1 Acido solforico (H_2SO_4) concentrato;
2.2. miscela di solfato di potassio (K_2SO_4), solfato di rame ($CuSO_4$) e selenio (Se) (rapporto p/p 10: 1: 0.1);
2.3. idrossido di sodio (NaOH) 10N;
2.4. acido solforico (H_2SO_4), 0.005N standard;
2.5. soluzione indicatrice di acido borico. Sciogliere 20 g di acido borico puro (H_3BO_3) in circa 700 mL di acqua calda e trasferire la soluzione raffreddata in un pallone da 1 litro contenente 200 mL di etanolo e 20 mL di indicatore (ottenuto sciogliendo 0.300 g di verde bromocresolo e 0.165 g di rosso di metile in 500 mL di etanolo). Dopo aver omogeneizzato accuratamente si porta a volume aggiungendo lentamente NaOH 0.05 N fino a che, prendendo 1 mL della soluzione e trattandolo con 1 mL di acqua, non si riscontri una variazione di colore da rosa a verde pallido.

3. Apparecchiature
3.1. Condensatore Liebig;
3.2. apparecchiatura Kjeldahl.

4. Procedimento
Mettere 10 g di suolo in un matraccio Erlenmeyer e trattare con 60 mL di acqua. Collegare il matraccio con un condensatore Liebig verticale e riscaldare per mantenere la miscela acqua-suolo in ebollizione per 60 minuti. Raffreddare la miscela, filtrarla sotto vuoto (carta da filtro Whatman No 42) e, se necessario, rifiltrare per rimuovere il materiale sospeso.
Determinare il contenuto di azoto nel filtrato con la procedura semimicro Kjeldahl:
riscaldare 20 mL del filtrato con 2 mL di acido solforico concentrato e 0.7 g di una miscela di K_2SO_4, $CuSO_4$ e Se (rapporto p/p 10:1:0.1) in un pallone Kjeldahl da 50 mL utilizzato per la distillazione in corrente di vapore. Riscaldare il pallone in un sistema di digestione micro-Kjeldahl fino alla limpidezza. Dopo la chiarificazione continuare la digestione per 1 ora.

Distillare successivamente il contenuto del pallone in corrente di vapore con 10 mL di NaOH 10N e raccogliere l'ammonio liberato durante la distillazione in un matraccio contenente una soluzione indicatrice di acido borico.
Determinare l'ammonio per titolazione con acido solforico 0.005 N.

Metodo II.2.2.

Metodo del permanganato di potassio in ambiente acido

1. Principio
Il metodo prevede l'ossidazione e l'idrolisi dell'azoto organico da parte di soluzioni di permanganato di potassio in ambiente acido.
Il permanganato acido permette di estrarre l'azoto dal pool dell'azoto organico del suolo per ossidazione ed idrolisi.

2. Reattivi
2.1. Soluzioni di permanganato di potassio ($KMnO_4$) 0.05, 0.1 e 0.2 N in H_2SO_4 1N;
2.2. acido solforico (H_2SO_4) 1N.

3. Apparecchiatura
3.1. Apparato per la distillazione in corrente di vapore

4. Procedimento
La procedura di estrazione è praticamente equivalente a quella proposta da Stanford e Smith ma gli estratti ottenuti dopo centrifugazione a seguito della iniziale, agitazione dei campioni di suolo con una soluzione di H_2SO_4 1N, vengono conservati per l'analisi dell'azoto ammoniacale.
Preparare le soluzioni estraenti di permanganato acido nel giorno dell'estrazione sciogliendo aliquote di $KMnO_4$ in soluzioni 1N di H_2SO_4 tali da ottenere una normalità finale di $KMnO_4$ pari a 0.05, 0.1 e 0.2.
La procedura di estrazione è la seguente:
porre 2 g di campione di suolo in tubi da centrifuga e tenere in agitazione con 50 mL di H_2SO_4 1N per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione a 1000 g analizzare il surnatante per la determinazione di N-NH_4^+ mediante la distillazione in corrente di vapore usando NaOH come alcalinizzante.
I residui di suolo vanno posti in agitazione con 50 mL di una soluzione acida di $KMnO_4$ per 1 ora a temperatura ambiente e successivamente centrifugare. Analizzare il surnatante raccolto per la determinazione di NH_4^+ come descritto sopra.

Metodo II.2.3.

Metodo di estrazione con una soluzione di $CaCl_2$ in autoclave

1. Principio
Questo metodo si basa sulla determinazione dell'N-NH_4^+ formato quando un campione di suolo viene trattato in autoclave a 121°C per 16 ore.

2. Reattivi

2.1. Soluzione di cloruro di calcio ($CaCl_2$) 0.01M. Sciogliere 1.5 g di $CaCl_2 \times 2H_2O$ in 1 litro d'acqua;
2.2. soluzione di cloruro di potassio (KCl) 4M. Sciogliere 300 g di KCl in 1 litro d'acqua;
2.3. ossido di magnesio. Riscaldare MgO in una muffola elettrica a 600-700°C per 2 ore. Raffreddare il prodotto in un disseccatore contenente idrossido di potassio (KOH) in gocce e conservare in una bottiglia a tenuta d'aria;
2.4. soluzione indicatrice di acido borico.

3. Apparecchiatura

3.1. Apparato per la distillazione;
3.2. palloncino da distillazione da 150 mL;
3.3. microburetta, 5 mL, graduata a intervalli di 0.01 mL.

4. Procedimento

Porre 10 g di suolo in un tubo di pyrex da 50 mL, aggiungere 25 mL di $CaCl_2$ 0.01M ed agitare delicatamente per mescolare il contenuto. Coprire con un foglio di alluminio e porre il tubo in autoclave. Portare la temperatura a 121°C ed effettuare il trattamento in autoclave per 16 ore. Lasciare quindi il tubo a raffreddare a temperatura ambiente e trasferire quantitativamente la miscela suolo-$CaCl_2$ in un pallone da distillazione da 150 mL. L'uso di circa 25 mL di KCl 4M facilita il trasferimento. Aggiungere 0.2-0.3 g di MgO e determinare l'ammontare di N-NH_4^+ liberato dalla distillazione in corrente di vapore dopo quattro minuti. Determinare il contenuto di azoto ammoniacale presente nel suolo prima dell'incubazione secondo la procedura utilizzata per l'analisi della miscela autoclavata e calcolare l'azoto disponibile per differenza fra i risultati di queste due analisi.

Metodo II.2.4.

Metodo biochimico di Bremner

1. Principio

Il campione di suolo è mescolato con sabbia di quarzo in rapporto 1:3 e la miscela è inumidita con acqua ed incubata a 30°C per due settimane in condizioni che permettano un'adeguata aereazione del campione senza perdite d'acqua. L'ammontare di azoto nitroso, nitrico ed ammoniacale del campione incubato viene poi stimato mediante estrazione con KCl 2N e successiva determinazione dell'azoto ammoniacale prodotto per mezzo di una distillazione, in corrente di vapore ed in presenza di ossido di magnesio e lega di Devarda. La quantità di azoto nitroso, nitrico ed ammoniacale presente nella miscela suolo-sabbia di quarzo prima dell'incubazione è determinata con lo stesso procedimento. L'azoto mineralizzabile nel campione di suolo viene calcolato dalla differenza tra i risultati di queste due analisi.

2. Reattivi

2.1. Lega di Devarda. Preparare questo reagente macinando una lega di buona qualità (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, o J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.Y.) fino a che il prodotto non passi attraverso un setaccio di 100 mesh e per almeno il 75% attraverso uno di 300 mesh. Conservare la lega così prodotta in una bottiglia a tenuta d'aria;

2.2. soluzione indicatrice di acido borico (vedi II.2.1., 2.5.);
2.3. acido solforico (H_2SO_4) 0.005N standard;
2.4. soluzione di cloruro di potassio (KCl) 2N: sciogliere 1.5 g di KCl in 10 litri d'acqua;
2.5. ossido di magnesio (MgO) (vedi II.2.1., 2.5.).

3. Apparecchiatura
3.1. Apparato per la distillazione in corrente di vapore;
3.2. palloni da distillazione;
3.3. microburetta, 5 mL, graduata a intervalli di 0.01 mL.

4. Procedimento
Mescolare 10 g di suolo con 30 g di sabbia di quarzo in un beaker da 100 mL di capacità e trasferire la miscela in una bottiglia a collo largo da 250 mL contenente 6 mL di acqua. Distribuire la miscela uniformemente sul fondo della bottiglia, chiuderne l'apertura con del parafilm ed incubare a 30°C per 14 giorni. Alla fine di questo periodo di incubazione aggiungere 100 mL di KCl 2N ed agitare per un'ora. Lasciare sedimentare e pipettare un'aliquota del surnatante liquido (circa 20 mL) in un palloncino da distillazione.
Determinare il contenuto di azoto nitroso, nitrico ed ammoniacale nella miscela suolo-sabbia di quarzo mediante raccolta e titolazione dell'ammoniaca liberata dalla distillazione in corrente di vapore in presenza di MgO e lega di Devarda. Determinare l'ammontare di azoto nitroso, nitrico ed ammoniacale presente nella miscela suolo-sabbia di quarzo prima dell'incubazione seguendo la stessa metodologia applicata alla miscela incubata e calcolare l'azoto mineralizzabile del campione di suolo dalla differenza esistente fra i risultati delle due analisi.

Metodo II.2.5.

Metodo biochimico di Stanford e Smith

1. Principio
Una miscela di suolo e sabbia di quarzo viene incubata in condizioni idriche e di temperatura ottimali per l'attività microbica. L'azoto minerale formato viene rimosso e determinato ad intervalli di tempo prefissati per la durata di 30 settimane.

2. Reattivi
2.1. Lega di Devarda;
2.2. soluzione indicatrice di acido borico (vedi II.2.1., 2.5.);
2.3. acido solforico (H_2SO_4) 0.005N standard;
2.4. soluzione dilavante di cloruro di calcio ($CaCl_2$) 0.01M;
2.5. soluzione nutritiva (0.002 M $CaSO4 \times 2H_2O$; 0.002 M $MgSO_4$; 0.005 M $Ca(HPO_4)_2 \times H_2O$ e 0.0025 M K_2SO_4);
2.6. sabbia di quarzo.

3. Apparecchiatura
3.1. Tubi da dilavamento da 50 mL o imbuti buchner di porcellana (Ø = 13cm);
3.2. apparato per la distillazione in corrente di vapore;
3.3. palloni da distillazione;
3.4. microburetta, 5 mL, graduata a intervalli di 0.01 mL.

4. Procedimento
4.1. *Metodo con tubi di dilavamento*
Un campione di 15 g di suolo essiccato all'aria e vagliato a 2 mm viene mescolato con sabbia di quarzo in rapporto 1:1 ed inserito in tubi da dilavamento da 50 mL al fondo dei quali è sistemato un filtro di lana di vetro.
Rimuovere l'azoto minerale inizialmente presente mediante dilavamento con 100 mL di $CaCl_2$ 0.01 M, seguito dalla somministrazione di 25 mL di una soluzione nutritiva priva di azoto (0.002 M $CaSO_4*2H_2O$; 0.002 M $MgSO_4$; 0.005 M $Ca(HPO_4)_2 \times H_2O$ e 0.0025 M K_2SO_4). Allontanare l'acqua in eccesso sotto vuoto (60 cm Hg). Tappare i tubi ed incubare a 35°C. Lo scambio gassoso attraverso la porzione aperta del tubo di dilavamento è sufficiente a mantenere un sistema aerobico. Dopo due settimane raccogliere l'azoto minerale mediante dilavamento con $CaCl_2$ 0.01 M e con la soluzione nutritiva priva di azoto, seguita dall'applicazione del vuoto come descritto sopra.
Rimettere i tubi ad incubare ed effettuare i dilavamenti dopo 2, 4, 8, 12, 16, 22 e 30 settimane).
Ripristinare il contenuto ottimale di acqua nel suolo ad ogni dilavamento.
Il dilavato viene trasferito in palloni Kjeldahl da 800 mL e diluito con 300 mL di acqua distillata. In seguito all'aggiunta della lega di Devarda (0.5 g) e di NaOH 10N (2 mL), l'azoto minerale (NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+) viene determinato mediante titolazione acida con H_2SO_4 0.005N dopo distillazione con acido borico.

4.2. *Metodo con imbuti buchner*
50 g di suolo vengono miscelati con 50 g di sabbia di quarzo e disposti in un imbuto buchner di porcellana (diametro esterno 13 cm) sul fondo del quale è stato sistemato un filtro di stoffa di acetato. La miscela deve formare uno strato omogeneo di uno spessore non superiore ai 2 cm. Particolare attenzione va posta alla granulometria della sabbia di quarzo che dovrà essere sempre compresa tra 0.2-0.8 mm poiché, agendo sull'aereazione del campione influisce in modo decisivo sui risultati analitici. La soluzione estraente di $CaCl_2$ è stata sostituita con $CaSO_4$ saturo per rendere gli estratti leggibili anche con metodi potenziometrici date le note interferenze che lo ione cloro esercita in questo tipo di misure. Infine è stata apportata una modifica alla temperatura di incubazione che è stata abbassata dai 35°C proposti da Stanford e Smith a 30°C per avere una migliore correlazione con la realtà di campo. L'umidità viene ripristinata mediante una pompa aspirante.
Su una aliquota degli estratti dopo filtrazione con filtro a pieghe viene determinato il contenuto in N- NO_3^-, N- NH_4^+ ed N- NO_2^- con i metodi più convenienti (colorimetrico, potenziometrico, ecc).

Metodi II.3.

ATTIVITÀ AZOTOFISSATRICE

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione della attività azotofissatrice nel suolo

Metodo II.3.1.

Determinazione dell'attività azotofissatrice su campioni di terreno

1. Principio
La riduzione dell'acetilene (C_2H_2) ad etilene (C_2H_4) è in genere utilizzata per una stima dell'attività nitrogenasica nei sistemi naturali. Entrambi i composti, infatti, possono venire facilmente dosati, anche a concentrazioni molto basse, con tecniche gas-cromatografiche e la reazione è altamente specifica perché nessun altro sistema enzimatico è in grado di ridurre l'acetilene.

2. Reattivi
2.1. N_2 se risulta necessario prevenire l'esposizione di campioni all'ossigeno;
2.2. C_2H_2 o $^{15}N_2$ adatta (vedi note tecniche) per esperimenti in campo;
2.3. fonte di gas con funzione di standard (vedi note tecniche) se desiderato;
2.4. sorgente di Ar o He;
2.5. fonte di O_2;
2.6. gas vettore N_2 per analisi con C_2H_2.

3. Apparecchiatura
3.1. Bottiglie con tappo a tenuta di gas, beute o barattoli in vetro con tappo a tenuta;
3.2. sacchi in plastica a bassa permeabilità. I sacchetti possono essere fermati per mezzo di tubi con tappo a tenuta o possono avere direttamente saldata alla superficie una pallina di silicone oppure setti in gomma siliconica o butilica per mezzo dei quali sia possibile inserire un ago di siringa;
3.3. spatole;
3.4. provette portacampioni per il trasferimento dei sedimenti;
3.5. pinzette;
3.6. forbici;
3.7. bisturi;
3.8. guanti;
3.9. sacchetti di plastica;
3.10. siringhe di taglia appropriata per l'addizione di C_2H_2 o $^{15}N_2$ al campione in esame;
3.11. siringa per prelievo gas;
3.12. siringhe monouso in plastica da 1 mL ed ago con o senza valvola in teflon;
3.13. pompa a vuoto elettrica o manuale;
3.14. gas-cromatografo con detector a ionizzazione di fiamma;
3.15. colonna C18 in Porapak (R);
3.16. per analisi con $^{15}N_2$ occorre uno spettrometro di massa.

4. Procedimento

Trasferire il campione scelto per l'analisi nell'opportuno contenitore. Campioni come pezzetti di radice possono essere trasferiti intatti o tagliati in pezzetti più corti ma prima devono essere superficialmente sterilizzati con appropriate soluzioni (ipoclorito, acqua ossigenata, clorammina T, nitrato di argento). E' raccomandabile per materiali biologicamente molto attivi (piante o animali) che il rapporto tra il volume occupato dalla fase gassosa (mm^3) rispetto al peso fresco del campione (grammi) sia almeno pari a 300, così da minimizzare i cambiamenti rapidi della composizione dell'atmosfera durante l'analisi. Il peso esatto del campione introdotto può essere convenientemente determinato dopo la determinazione del contenuto di umidità.

Può essere necessario aggiustare l'umidità del campione di suolo o sedimento, può essere fornita un opportuna fase acquosa a parti di piante acquatiche, se occorre stimolare l'attività azotofissatrice può essere necessario aggiungere fonti organiche di carbonio o azoto combinato.

Prima dell'incubazione occorre chiudere i contenitori con tappi appropriati o saldare le superfici dei sacchetti di plastica.

Occorre stabilire l'atmosfera appropriata per l'analisi. Nel caso del saggio di riduzione dell'C_2H_2 l'atmosfera del sistema non dovrebbe essere alterata; se occorre una riduzione delle concentrazioni di O_2, il sistema deve essere saturato con una miscela di N_2-O_2 o di un parziale arricchimento dell'atmosfera con N_2. Quando si impiega $^{15}N_2$ è necessario rimuovere completamente dall'atmosfera l'N_2 e sostituirlo, con un'atmosfera di Ar o He, con $^{15}N_2$.

Per introdurre C_2H_2 o $^{15}N_2$ nel sistema si deve rimuovere con una siringa un volume di atmosfera uguale a quello del gas che dovrà essere introdotto. In seguito si inietta C_2H_2 in quantità tale da ottenere una pressione parziale di 0,05-0,1 atm (una concentrazione maggiore può essere necessaria alla saturazione della nitrogenasi in alcuni sistemi contenenti microrganismi e in particolari tipi di sedimenti), o $^{15}N_2$ in quantità tale da ottenere una pressione parziale di almeno 0,4 atm.

Introdurre un gas con funzione di standard interno, se desiderato (vedi Note), quindi incubare *in situ*, o a temperatura controllata in laboratorio. Condizioni di luce/buio possono essere utilizzate in base all'obiettivo preposto.

Alla fine dell'incubazione campionare la fase gassosa ad intervalli di tempo, utilizzando una siringa (0,1-1,0 mL) per analisi gascromatografiche. La frequenza di campionamento dipende dall'attività del campione e dalle condizioni di campionamento, anche se analisi ogni 1-4 ore sono quelle maggiormente desiderabili; attività mediamente basse possono richiedere campionamenti numerosi, per periodi di tempo più lunghi.

Metodo II.3.2.

Determinazione dell'attività azoto fissatrice effettuata su carote

1. Principio

L'uso di carote di suolo o sedimenti, con o senza piante intatte, ha il vantaggio di limitare gli agenti di disturbo rispetto allo studio di parti isolate dal sistema. Ciò è vero soprattutto per campioni racchiusi nei contenitori di prelevamento.

2. Reattivi

2.1. Una fonte di C_2H_2 o di $^{15}N_2$ adatta (vedi Note) per esperimenti in campo;

2.2. una fonte di gas con funzione di standard (vedi Note) se desiderato; una siringa riservata unicamente a questo scopo;

2.3. sorgente di Ar o He;

2.4. sorgente di O_2.

3. Apparecchiatura

3.1. Trivelle o tubi cilindrici in acciaio o altro materiale di almeno 10 cm di diametro, di lunghezza variabile (usualmente 15-20 cm) che possono avere i bordi inferiori affilati. Per alcuni esperimenti può essere desiderabile chiudere il fondo del cilindro di campionamento con fogli plastificati o metallici saldati con opportuni cementi, gomma butilica o siliconica;

3.2. camera di analisi. Deve essere sufficientemente ampia per contenere il campione intatto, o nel caso di campioni con fondo ermeticamente chiuso deve essere saldata opportunamente alla parte superiore del portacampione. La camera può essere in vetro, in metallo rigido a tenuta gassosa, o in plastica e deve avere un setto per l'iniezione ed il prelievo della fase gassosa;

3.3. siringhe di taglia appropriata per l'addizione di C_2H_2 o $^{15}N_2$ al campione in esame;

3.4. siringhe per il campionamento. Le siringhe più convenienti da utilizzare sono siringhe monouso in plastica da 1 mL munite di ago con o senza valvola in teflon. Siringhe di vetro con o senza valvole possono ugualmente essere utilizzate, ma sono generalmente più costose. Se si presenta la necessità di conservare i campioni, fare riferimento a quanto riportato nelle note tecniche;

3.5. pompa a vuoto elettrica o manuale.

4. Procedimento

Quando viene effettuato il carotaggio, può essere desiderabile campionare piante individuali o campioni "at random" con vegetazione più o meno uniforme. Per alcuni sistemi (p. es. zone salmastre) può risultare notevolmente più pratico utilizzare sezioni orizzontali di suolo piuttosto che il metodo del carotaggio.

Si chiude il campione apponendo la base sul fondo e la camera di misurazione sul coperchio o chiudendo l'intera carota in un contenitore separato. Quindi, si stabilisce l'atmosfera appropriata per l'analisi: si introduce C_2H_2 o $^{15}N_2$, come descritto per i campioni isolati dal sistema, ed un gas con funzione di standard interno, se desiderato (vedi Note).

Quindi si incuba *in situ* o a temperatura controllata in laboratorio. Condizioni di luce/buio possono essere utilizzate in base all'obiettivo preposto.

Alla fine dell'incubazione si campiona la fase gassosa ad intervalli di tempo con siringa (0,1-1,0 mL) per le analisi gascromatografiche. La frequenza di campionamento dipende dall'attività del campione e dalle condizioni di campionamento. Il manifestarsi della fase stazionaria è meno frequente, in questo tipo di analisi rispetto a quella effettuata sui campioni separati dal sistema, perché le perturbazioni sono minimizzate. Periodi di incubazione di 2-6, 10-24 o 10-48 ore sono i più appropriati per questo tipo di analisi.

Per analisi dell'$^{15}N_2$ la percentuale di atomi di ^{15}N in eccesso dell'atmosfera sperimentale e il campionamento di N_2 fissato devono essere determinati ad intervalli appropriati.

Nelle analisi di campioni provenienti da incubazioni con $^{15}N_2$ si deve escludere la presenza di CO_2 e N_2O al fine di evitare interferenze nella determinazione dei diversi isotopi dell'azoto.

L'arricchimento in $^{15}N_2$ nel campione prelevato viene determinato come descritto da Bergensen (1980).

5. Espressione dei risultati

In molti casi la presentazione dei dati in base alla superficie o al volume è adeguata e deve essere calcolata dalle dimensioni note del campione. I dati possono inoltre essere convertiti sulla base dei pesi freschi o secchi dei campioni di suolo o radici, eseguendo la determinazione dell'umidità.

Metodo II.3.3.

Misura dell'attività azotofissatrice *in situ* con sistema aperto

1. Principio

Il principio su cui si basa è relativamente semplice: in un recipiente chiuso, inserito nel suolo, viene iniettato acetilene ed un opportuno gas che funge da standard interno; ad appropriati intervalli di tempo, vengono prelevati campioni di gas da analizzare con il gas-cromatografo.

2. Reattivi

2.1. Fonte di gas da utilizzarsi come standard interno;

2.2. Fonte di C_2H_2. CaC_2 o C_2H_2 in bombola.

3. Apparecchiatura

3.1. Recipienti cilindrici di grandezza appropriata (10-30 cm di diametro e 15-30 cm di altezza, in dipendenza del sito di analisi, del contenuto di acqua, ecc.) in plastica acrilica o in materiale metallico. Ciascun tipo di recipiente deve avere sul bordo superiore una scanalatura contenente acqua o un altro sistema che serva per l'inserimento della parte superiore da sigillare a tenuta. La parte superiore può essere rigida (fogli o cilindri in plastica acrilica) o flessibile (semplici fogli o sacchi in plastica a bassa permeabilità o polietilene). Essa è mantenuta attaccata alla parte inferiore o per inserimento nella scanalatura del cilindro inferiore per mezzo di un bordo rinforzato e rigido in PVC oppure fissata utilizzando gomma siliconica, butilica o collanti simili. In ogni caso, questa copertura presenta setti in gomma o palline di silicone che permettono di prelevare campioni di atmosfera contenuti nel sistema, per mezzo di siringa.

3.2. Una siringa della capacità di almeno 500 mL è richiesta se viene utilizzato C_2H_2 in bombola;

3.3. Siringa riservata per standard.

3.4. Termometro per la misurazione della temperatura all'interno del sistema.

3.5. Siringhe per il campionamento. Le siringhe più convenienti da utilizzare sono siringhe monouso in plastica da 1 mL ed ago con o senza valvola di teflon. Siringhe di vetro con o senza valvole possono ugualmente essere utilizzate, ma sono generalmente più costose. Se si presenta la necessità di conservare i campioni, fare riferimento a quanto riportato nelle note tecniche.

4. Procedimento

Scegliere il luogo di analisi ed inserire il cilindro nel suolo. La scelta di campioni rappresentativi, può rivelarsi difficile o addirittura impossibile per vegetazioni naturali, dove è preferibile un posizionamento "casuale" all'interno delle comunità tipo. In studi diurni, le analisi devono essere iniziate in momenti diversi del giorno.

Introdurre nel cilindro un termometro (se desiderato) e un beaker o una beuta contenente carburo di calcio sufficiente per generare 0,1 atm di C_2H_2, se viene scelta questa forma di produzione di acetilene.
Applicare la parte superiore del recipiente e sigillare con acqua o altro materiale opportuno.
Introdurre C_2H_2 attraverso iniezione dell'opportuno volume prelevato da bombola o versando acqua sul carburo subito prima di fissare la parte superiore del dispositivo alla parte sottostante (prima dell'iniezione di C_2H_2 un volume di atmosfera pari a quello di C_2H_2 introdotto deve essere prelevato, ma questo non risulta sempre strettamente necessario).
Introdurre propano o un altro tipo di gas con funzione di standard interno.
Campionare la fase gassosa ad intervalli di tempo con siringa (0,1-1,0 mL) per le analisi gascromatografiche. La frequenza di campionamento dipende dal sistema oggetto di studio ma è raccomandabile che i campioni siano prelevati dopo 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 24 e 48 ore, così che possano essere osservate variazioni nel tempo.
Campionamenti rapidi della durata di 2-5 ore sono preferibili per minimizzare i cambiamenti nell'atmosfera e la perdita di C_2H_2 dal sistema. Se si presenta la necessità di conservare i campioni, fare riferimento a quanto riportato nelle note tecniche.

5. Espressione dei risultati

Un esempio di calcolo che coinvolge uno standard interno gassoso è fornito nelle note tecniche. I tassi calcolati di C_2H_4 prodotto possono essere messi semplicemente in relazione all'area di saggio o, per alcune applicazioni, la massa radicale presente nell'area di saggio deve essere prelevata e i tassi messi in relazione al peso secco delle radici.

6. Note

6.1. *Atmosfere necessarie per il saggio della riduzione del C_2H_2.*
Nei suoli che sono dotati di moderata porosità la saturazione dei siti di azotofissazione avviene facilmente con una pressione parziale di C_2H_2 di 0,05 atm ma, a causa dell'alta solubilità del C_2H_2, anche 0,2 atm possono essere richieste in suoli saturi di acqua. In alcuni casi, per es. in radici isolate da un ambiente caratterizzato da basse pressioni di ossigeno, si può verificare l'inattivazione della nitrogenasi; tale inconveniente può essere eliminato riducendo il più possibile l'esposizione del campione all'aria e riducendo la pressione parziale dell'O_2 ad un valore intorno a 0,1-0,05 atm.

6.2. *Standard interni*
In molti casi lo stesso C_2H_2 può fungere da standard interno. Tuttavia in campioni dotati di una significante fase acquosa o per saggi da effettuarsi *in situ*, sarebbe meglio utilizzare altri gas dotati di solubilità e di caratteristiche di diffusione vicine a quelle possedute da C_2H_2, come etano, propilene e propano. Nella tabella 1 sono riportate alcune proprietà di questi gas comparati con quelle di C_2H_2 e C_2H_4.
Essi differiscono non solo in relazione alla solubilità in acqua ma anche nel grado di eluizione dalle colonne Porapak utilizzate comunemente nell'analisi dei campioni; inoltre, il loro assorbimento nel suolo decresce nell'ordine seguente: propilene> metano> etano> propano. La scelta dello standard interno deve essere fatta molto accuratamente considerando il tipo di campione da sottoporre all'analisi e la compatibilità con il sistema di gas cromatografia utilizzato.

Tabella 1. Alcune proprietà di gas standard interni comparate con quelle di acetilene ed etilene. da Knowels (1980).

Proprietà	Metano	Acetilene	Etilene	Etano	Propilene	Propano
Solubilità in acqua a 20°C *	0,036	1,05	0,122	0,0496	0,22	0,0394
Ordine di eluizione su:						
Porapak R	1	3	2	3	4	5
Porapak N	1	4	2	3	5	5
Porapak Q	1	2	3	4	5	6

*La solubilità è espressa in cm^3 di gas per cm^3 di acqua a 20°C.

I calcoli, assumendo di utilizzare quale standard interno il propano, possono essere eseguiti nel modo seguente (Balandreau e Dommergues, 1973):

$$R= e2V2 - e1V1 : a\ (t2 - t1)$$

dove R è la quantità di C_2H_4 prodotta in mol m^{-2} h^{-1}, e1 ed e2 le concentrazioni di C_2H_4 dei campioni presi ai tempi t1 e t2 in mol mL-1, V1 e V2 i volumi in mL occupati dai gas ai tempi t1 e t2.

Poiché:

$$V1 = P / p1 \text{ e } V2 = P / p2$$

dove

p1 e p2 sono le concentrazioni di $C_3 H_8$ dei campioni presi ai tempi t1 e t2 in mol^{-1} mL^{-1},

P la quantità di C_3H_8 iniettata in moli,

a la superficie inclusa in m^2,

t1 e t2 i tempi in ore dei campionamenti.

Sarà:

$$R= e2\ P / p2\ - e1\ P / p1 : a\ (t2\ - t1) = \ P/a\ (t2\ - t1)\ x\ (e2 / p2\ - e1 / p1\ )$$

La sensibilità relativa del gas cromatografo a C_2H_2 e a C_3H_8 può essere determinata iniettando quantità equimolari dei due gas.

Se e'/p' è il rapporto delle altezze dei picchi di C_2H_4 e di C_3H_8 (con l'attenuazione inclusa) ottenuta in tale calibrazione e he1 / hp1 e he2 / hp2 sono i rapporti delle altezze dei picchi di C_2H_4 e di C_3H_8 ottenuti nei campioni ai tempi t1 e t2 allora:

$$R= P\ p' / ae'(t2\ - t1)\ x\ (h\ e2 / hp2\ -h\ e1\ / hp1)$$

In questo caso, per ciascun particolare esperimento in cui la quantità di propano iniettata e la sensibilità del gas-cromatografo sono costanti, sono necessari solo i rapporti delle altezze dei picchi dei campioni di gas da analizzare.

6.3. *Atmosfere necessarie per il saggio con* $^{15}N_2$

Per questo saggio è necessario rimuovere l'N_2 presente nell'atmosfera e sostituirlo con la maggior quantità di $^{15}N_2$ possibile. Perciò è necessario far fluire nel campione da analizzare una corrente di Ar o He seguita dall'aggiunta della necessaria quantità di $^{15}N_2$. La pressione parziale di $^{15}N_2$ dovrebbe essere compresa tra 0,4-1,0 atm.

6.4. *Approvvigionamenti di gas per usi in campo*
Assai spesso, in questo tipo di analisi, risultano utili piccoli contenitori per gas in metallo o palloni in gomma. Tuttavia, C_2H_2 può essere generato anche a partire da CaC_2 (carburo di calcio). L'$^{15}N_2$ viene preparato precedentemente in laboratorio a partire da $(^{15}NH_4)_2SO_4$ ed eventualmente trasportato in campo in siringhe di vetro a tenuta.

6.5. *Conservazione dei campioni di gas prelevati per analisi*
La conservazione dei campioni da sottoporre all'analisi gas-cromatografica può essere fatta con uno dei modi seguenti:
- in siringhe di vetro (p. es. Glaspak) dotate di valvola per ridurre le perdite;
- in tubi tipo Vacutainer o bottigliette in cui sia stato fatto il vuoto precedentemente;
- iniettando i campioni da analizzare in bottigliette riempite con acqua in cui l'acqua in eccedenza esce da un secondo ago inserito nel setto; in questo caso può essere necessaria una correzione per la solubilità dei componenti di interesse nell'acqua contenuta nel recipiente.

Metodo II.3.4.

Misura simultanea dell'azotofissazione e della denitrificazione

1. Principio
Poiché l'azotofissazione e la denitrificazione possono avvenire contemporaneamente nello stesso suolo, può essere utile determinare contemporaneamente C_2H_4 e N_2O. Poiché in presenza di C_2H_2 la riduzione di N_2O è completamente inibita, la misura dell'accumulo di N_2O presente nel sistema risulta essere una stima del grado di denitrificazione totale di un suolo.

2. Procedimento
Per effettuare la contemporanea determinazione di C_2H_4 e di N_2O sono necessari tipi di detector diversi da quelli impiegati per la determinazione dell'etilene, che devono risultare più sensibili all'N_2O, come quelli a conduttività termica, ad ultrasuoni, a ionizzazione di elio o a cattura di elettroni.
La determinazione contemporanea dei due gas può essere ottenuta ponendo una derivazione a forma di T dietro l'iniettore per i gas: un braccio del T è connesso ad una colonna adatta per la separazione del N_2O (p. es. una colonna di 2-3 m x 3 mm Porapak Q, di 80-100 di porosità) e termina ad un detector a conduttività termica (TCD). L'altro braccio è connesso ad una colonna adatta per la separazione degli idrocarburi (per es. una colonna di 2 m x 3 mm Porasil C/isocianato di metile, di 80-100 di porosità) e termina con un detector a ionizzazione di fiamma (FID). Il flusso del gas di trasporto (elio) è regolato a circa 16 mL min^{-1} per il FID e a 46 mL min^{-1} per il TCD. La temperatura della colonna è mantenuta a 50°C e i due detector sono connessi con due pennini per registrare i dati.

Metodo II.4.

ATTIVITÀ AMMONIOSSIDANTE

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione della attività ammonio ossidante del suolo.

Metodo II.4.1.

Misura dell'attività nitrificante potenziale (PNA)

1. Principio
La misura della PNA viene determinata secondo le modalità di Belser e Mays, 1980 e, dato che si svolge in un tempo ristretto, viene presa come un indice istantaneo della popolazione ammonio ossidante attiva.

2. Procedimento
20 g di suolo vengono pesati in una beuta Erlemayer di 250 mL; si aggiungono 50 mL di tampone fosfato 2mM (pH 7.2 - 7.5) contenente $(NH_4)_2SO_4$ alla concentrazione di 0.5 o 1mM; la sospensione viene incubata a 26°C su un agitatore rotante. La produzione di nitriti o di nitriti più nitrati viene misurata ad intervalli regolari durante un periodo di 4-6 ore prelevando un'aliquota della sospensione (1 o più mL) e centrifugandola a 15000 x g per 5 minuti; il surnatante viene addizionato con un volume identico di 2M KCl per arrestare la nitrificazione. Per la lettura dei soli nitriti aggiungere alla sospensione 1 mL di 1M $KClO_3$.
Per determinare la PNA massima in funzione del pH, aggiungere 1N HCl o 1N NaOH alla sospensione al fine di ottenere una gamma di pH tra 4.5 e 8.5 con intervalli di 0.5.
L'acetilene (conc.~10Pa) inibisce la nitrificazione autotrofa, ma non quella eterotrofa; questo consente, eliminando il clorato dalla sospensione, di misurare la produzione di NO_3^- in presenza ed in assenza di acetilene: la differenza rappresenta il valore della nitrificazione eterotrofa.
La determinazione di nitriti, nitrati e ammonio nei suoli viene misurata in estratti da soluzioni 1:5 (suolo: 2 M KCl).

3. Espressione dei risultati
La PNA si stabilisce determinando la produzione di NO_3^- o NO_2^- da NH_4^+ mediante l'Autoanalyzer o con procedure spettrofotometriche dirette utilizzando il reattivo di Griess-Illoway.

Metodi II.5.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DENITRIFICANTE DEL SUOLO

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione della attività denitrificante del suolo.

Metodo II.5.1.

Valutazione dell'attività denitrificante *in situ*

1. Principio
La determinazione dell'attività denitrificante può esprimere, secondo quale sia la metodologia adottata, la reale intensità del processo nel suolo in un determinato momento o la sua potenzialità (potenziale di denitrificazione).
Tale metodo permette la determinazione dell'N_2O svolto dalla superficie indisturbata del suolo, tramite A.I.T. e dispositivi infissi nel suolo (*cover-box*).

2.Reattivi
2.1.carburo di calcio in granuli;
2.2.cloruro di rame $CuCl_2$ in soluzione acquosa all'8%.

3. Apparecchiatura
3.1. Cilindri in acciaio di 40 cm di diametro e 35 cm di altezza, aperti inferiormente e muniti superiormente di coperchio mobile in plexiglas, a tenuta di gas e provvisto di un foro con setto perforabile;
3.2. siringhe monouso da 10 mL e da 1 mL; siringhe di precisione per gas cromatografia da 0,1 mL, 0,5 mL e 1 mL;
3.3. vial da 5 mL, con tappo perforabile e ghiera di protezione in alluminio (tipo flacone per antibiotici) a tenuta di vuoto, riempiti con cloruro di calcio granulare (pezzatura 1-2 mm);
3.4. sistema per vuoto;
3.5. contenitori monouso in alluminio, di forma tronco conica e, superiormente di 8 cm ca. di diametro;
3.6. *gas cromatografo con rivelatore a cattura di elettroni* (ECD), equipaggiato con colonna di acciaio, lunga 2 m e con diametro interno di 2 mm, impaccata con Poropak Q 80-100 mesh.

4. Procedimento
Dopo aver inserito nel suolo i cilindri metallici (non meno di due per ogni trattamento) alla profondità di 5 cm, si procede alla somministrazione dell'acetilene ponendo all'interno di ogni cilindro un contenitore di alluminio con 25 mL di soluzione di cloruro di rame in cui si

versano 8 g di carburo. Questa operazione consente lo sviluppo della quantità di acetilene necessaria per raggiungere una concentrazione della medesima nel suolo mediamente non inferiore al 4-5%. Si chiude rapidamente il cilindro con il coperchio e si attende mezzora circa per favorire la completa diffusione dell'acetilene prodotta nella reazione. Trascorso tale tempo si effettua un primo prelievo di atmosfera all'interno del cilindro tramite perforazione del setto di gomma inserito nel coperchio con una siringa da 10 mL, per valutare l'N_2O presente al tempo zero e si ripete il prelievo dopo due ore. In entrambi i casi il campione gassoso prelevato viene rapidamente trasferito nei *vial* sotto vuoto e il cui contenuto di cloruro di calcio permette l'elimazione del vapore acqueo che disturba le analisi. Queste potranno essere effettuate entro breve tempo dal campionamento o anche dopo diversi giorni, avendo cura però di conservare i vial a 5°C.
L'analisi della miscela gassosa viene effettuata per via gas cromatografica con rivelatore a cattura di elettroni dopo passaggio in colonna con Poropak Q con un flusso di elio di 40 mL × $min.^{-1}$ e make-up di azoto con flusso di 20 mL × min^{-1}. La quantità di miscela gassosa immessa in colonna é di 1 mL, tramite siringa monouso corredata di ago in acciaio per gas cromatografia. Le condizioni strumentali più convenienti sono risultate essere quelle che seguono: temperatura all'iniettore 225°C, temperatura della camera 50°C, temperatura al rivelatore 350°C; tensione d'impulso (*pulse width)* 1 microSiemens, tensione di eccitazione 50 Volt; la corrente che regola la frequenza può variare tra 1 e 1,5 nA e a questa deve corrispondere una frequenza non inferiore a 4000 Hertz.

5. Espressione dei risultati

Le concentrazioni di N_2O misurate dallo strumento vengono calcolate tramite riferimento ad una retta di taratura eseguita preventivamente. La trasformazione delle concentrazioni in quantità assolute di N_2O richiede la conoscenza del volume libero interno dei cilindri. Questo può essere calcolato in modo molto approssimativo, qualora la superficie del suolo sia quasi perfettamente piana, misurando l'altezza media da terra del cilindro, o in maniera esatta tramite delle prove in bianco con un gas di riferimento (p. es. il propano) che viene introdotto nel cilindro in quantità nota.

6. Note

L'esecuzione della prova deve essere evitata nelle ore più calde della giorno dato l'effetto radiante che i cilindri metallici possono svolgere con conseguente notevole aumento della temperatura e dell'umidità dell'atmosfera al loro interno. Qualora non sia possibile procedere alle prove nelle prime ore del mattino (che sono risultate essere le più valide anche al fine dell'estrapolazione dei risultati alle 24 ore) è necessario procedere alla coibentazione dei cilindri con vari accorgimenti. Tra questi il più valido risulta essere quello di rivestire il cilindro con schiuma poliuretanica e schermare il coperchio con paglia o simili.
Data l'elevata solubilità dell'N_2O in acqua nel caso di suoli saturi o prossimi alla saturazione é opportuno procedere al calcolo del protossido di azoto disciolto nell'acqua del suolo che va aggiunto a quello misurato nello spazio di testa. Il calcolo può essere fatto usando il coefficiente di Bunsen nella seguente equazione:

$$M = C_g (Vg + V_1 \alpha)$$

dove M é la quantità totale di N_2O (nell'acqua e nella fase gassosa), Cg la concentrazione di N_2O nella fase gassosa, Vg il volume della fase gassosa, V1 il volume della fase liquida ed α il coefficiente di Bunsen. Per comodità del lettore si riportano alcuni valori di questo coefficiente relativi al protossido di azoto.

Temp. °C	coeff. di Bunsen
10	0,882
15	0,743
20	0,632
25	0,544

Metodo II.5.2.

Valutazione della denitrificazione potenziale del suolo D.E.A.

1. Principio

Tale saggio, tramite A.I.T. ed incubazione di un campione di suolo in anaerobiosi, permette di determinare del potenziale enzimatico denitrificante del suolo (*Denitrifying Enzyme Activity*, D.E.A.).

2. Reattivi

2.1. Acqua sterile;
2.2. soluzione 1,4 mM di KNO_3;
2.3. soluzione 1 mM di cloramfenicolo;
2.4. acetilene PP in bombola;

3. Apparecchiatura

3.1. Beute Pyrex, con collo senza bordo, da 50 mL;
3.2. tappi perforabili in gomma al silicone, con bordo ribaltabile;
3.3. siringhe monouso da 1 e da 10 mL;
3.4. iringhe per gas cromatografia da 0,1 mL, 0,5 mL e 1 mL;
3.5. contenitori portatili per gas da 1,5 L, a volume variabile;
3.6. plastigas;
3.7. vial da 5 mL, con tappo perforabile e ghiera di protezione in alluminio (tipo flacone per antibiotici) a tenuta di vuoto, riempiti con cloruro di calcio granulare (pezzatura 1-2 mm);
3.8. sistema per vuoto;
3.9. cabina per anaerobiosi, con atmosfera di N_2 (80%), CO_2 (15%), H_2 (5%);
3.10. gas cromatografo con rivelatore a cattura di elettroni (ECD), equipaggiato con colonna di acciaio, lunga 2 m e con diametro interno di 2 mm, impaccata con Poropak Q 80-100 mesh.

4. Procedimento

Campioni di 20 g di suolo (nel caso dei suoli agrari o degli orizzonti minerali) o di 10 g (nel caso degli orizzonti organici dei suoli agrari) vengono disposti in beute da 50 mL ed umidificati preventivamente fino al 50% della loro capacità di ritenuta idrica con acqua sterile.

Quindi si trasferiscono le beute nella cabina per anaerobiosi e si procede alla aggiunta di 10 mL di soluzione costituita da una miscela delle soluzioni di nitrato di potassio e di cloramfenicolo in modo da ottenere una concentrazione del primo pari a 20 µg per g di suolo e pari a 300 µg per g di suolo del secondo.

Si tappano le beute e si aggiunge C_2H_2 con una siringa da 10 mL per raggiungere la concentrazione di questa del 10 % v/v. Terminata quest'ultima operazione si dispongono le beute su un agitatore orbitale a 120 r.p.m. in modo da ottenere una fanghiglia. Questo consente di favorire al massimo le reazioni tra il substrato e la carica enzimatica denitrificante presente nel suolo e di ridurre al massimo la durata della prova. Da questo momento si inizia a calcolare il tempo di incubazione (2 h) nel corso del quale si effettuano tre prelievi del gas nello spazio di testa delle beute: il primo immediatamente all'avvio dell'incubazione (tempo zero), il secondo dopo un ora e il terzo dopo due ore. I campioni gassosi prelevati vengono trasferiti nei *vial*, come descritto anche nella metodica precedente, e ivi conservati in attesa dell'analisi al gas cromatografo.

La metodologia analitica gas cromatografica non differisce da quella descritta sopra per la valutazione dell'attività denitrificante *in situ* e ad essa si rimanda, tenendo presente che, in questo caso, é sempre necessario procedere al calcolo dell'N_2O disciolto nella fase acquosa.

Metodi III.1.

DETERMINAZIONE DEL POTENZIALE NITRIFICANTE

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione del potenziale nitrificante del suolo.

Metodo III.1.1.

Determinazione del potenziale nitrificante del suolo condizionato alla capacità di campo

1. Principio
Il metodo, si basa sull'incubazione del suolo trattato con ammonio solfato e sulla misura del contenuto di nitrati prodotti dopo 3 settimane di incubazione a 25°C.

2. Reattivi
Nel corso dell'analisi si utilizzano acqua distillata e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

2.1. Ammonio solfato, $(NH_4)_2SO_4$, soluzione 0,2 mol/L: in un becher da 1000 mL si sciolgono 26,428 g di $(NH_4)_2SO_4$ con circa 700 mL di acqua. Si travasa in un matraccio tarato da 1000 mL e quindi si porta a volume con acqua;

2.2. soluzione estraente di potassio solfato 0,5 mol/L o di potassio cloruro 2 mol/L: si sciolgono 87,13 g di K_2SO_4 o 149,12 g di KCl con circa 700 mL di acqua in un becher da 1000 mL. Si travasa in un matraccio tarato da 1000 mL e si porta a volume con acqua.

3. Apparecchiatura
Corrente attrezzatura da laboratorio e in particolare:

3.1. centrifuga;
3.2. agitatore meccanico;
3.3. camera termostatica.

4. Procedimento
4.1. *Determinazione del contenuto iniziale di azoto nitrico presente nel suolo*
Si pesano 20 g di suolo fresco in una bottiglia di polietilene da 250 ml, si aggiungono 100 mL della soluzione estraente e si agita per 60 minuti. Si centrifuga, si filtra (Whatman n.42) e nell'estratto limpido si determina il contenuto di azoto nitrico.

4.2. *Incubazione*
Si pesano 100 g di suolo fresco in un becher e si aggiungono 2 mL della soluzione di $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 mol/L ed acqua in quantità sufficiente per portare il suolo alla capacità di campo. Si tappa il becher con un velo di parafilm leggermente forato, si pesa e si pone in incubatore a 25°C in assenza di luce per 3 settimane. E' necessario pesare il becher settimanalmente e, se occorre, aggiungere acqua allo scopo di mantenere l'umidità del suolo alla capacità di campo.

4.3. *Prova in bianco*
Si effettua parallelamente una prova in bianco nelle stesse condizioni, omettendo il solfato di ammonio.

4.4. *Estrazione dell'azoto nitrico*
Alla fine dell'incubazione si pesano 20 g di suolo in una bottiglia di polietilene da 250 mL e si aggiungono 100 mL di soluzione estraente. Si agita su agitatore meccanico per 60 minuti a temperatura ambiente, si centrifuga a 4.000 giri/min per 5-10 minuti (oppure si lascia in riposo 30 minuti) e quindi si filtra su filtro Whatman n. 42. Su un'aliquota del filtrato si dosa poi l'azoto nitrico.

5. Espressione dei risultati
I risultati vengono espressi in µg di N-NO_3^- g^{-1} di suolo seccato in stufa a 105°C .
Il valore dell'attività nitrificante "potenziale" sarà ricavato per differenza:

$$No = Nt-Ni$$

dove:
No è l'attività nitrificante potenziale;
Nt è il contenuto di azoto nitrico nel campione trattato con solfato di ammonio;
Ni è il contenuto iniziale di azoto nitrico.
Il valore dell'attività nitrificante "attuale" sarà ricavato per differenza:

$$Nc = Nn-Ni$$

dove:
Nc è l'attività nitrificante attuale;
Nn è il contenuto di azoto nitrico nel campione non trattato
(prova in bianco);
Ni è il contenuto iniziale di azoto nitrico.

Metodo III.1.2.

Misura del potenziale nitrificante sulla sospensione del suolo (*a*)

1. Principio
In questo metodo, i campioni di suolo sono trattati con un eccesso di liquido (*soil slurry*) ed incubati per 24 ore sotto agitazione continua in condizioni ottimali di umidità, aerazione e contenuto di fosforo e azoto ammoniacale. Il contenuto di nitrati viene misurato sulla sospensione del suolo prelevata ad intervalli di tempo prestabiliti.

2. Reattivi
Nel corso dell'analisi si utilizzano acqua distillata e reagenti di qualità analitica riconosciuta.
2.1. Ammonio solfato, $(NH_4)_2SO_4$, soluzione 50 mmol/L: in un becher da 1000 mL si sciolgono 6,607 g di $(NH_4)_2SO_4$ con circa 700 mL di acqua. Si travasa in un matraccio tarato da 1000 mL e quindi si porta a volume con acqua.
2.2. Fosfato bipotassico, K_2HPO_4, soluzione 0,2 mol/L: in un becher da 100 mL si sciolgono 3,484 g di K_2HPO_4 con circa 70 mL di acqua. Si travasa in un matraccio tarato da 100 mL e quindi si porta a volume con acqua.
2.3. Fosfato monopotassico, KH_2PO_4, soluzione 0,2 mol/L: in un becher da 100 mL si sciolgono 2,722 g di KH_2PO_4 con circa 70 mL di acqua. Si travasa in un matraccio tarato da 100 mL e quindi si porta a volume con acqua.
2.4. Soluzione tampone a pH 7,2 (1,5 mmol/L di NH_4^+ e 1 mmol/L di PO_4^{-3}): si prelevano 3,5 mL della soluzione di K_2HPO_4, 1,5 mL della soluzione di KH_2PO_4 e 15 mL della soluzione di $(NH_4)_2SO_4$ e si introducono in un matraccio tarato da 1000 mL. Si porta a

volume con acqua dopo aver aggiustato il pH a 7,2 con una soluzione diluita di H_2SO_4 o di NaOH. La soluzione è chimicamente stabile ma occorre ripreepararla dopo un certo periodo perché può essere contaminata da crescita microbica. Conservare le soluzioni in frigorifero.

3. Apparecchiatura

Corrente attrezzatura da laboratorio e in particolare:

3.1. Centrifuga.

3.2. Agitatore oscillante.

3.3. Camera termostatica.

4. Procedimento

4.1. *Incubazione*

Si pesano 15 g di suolo fresco (10 g se il suolo presenta un contenuto elevato di sostanza organica) in una beuta da 250 mL e si aggiungono 100 mL di soluzione tampone a pH 7,2. Si chiude la beuta con un tappo di cotone o di gomma forato e si agita per 24 ore a 25°C.

4.2. *Campionamento*

Si effettuano 4 campionamenti (2, 4, 22 e 24 ore) al fine di esaminare la cinetica del processo.
Si prelevano, nel momento in cui cessa l'agitazione, 10 mL della sospensione omogenea o una quantità superiore, nel caso che la sospensione venga filtrata, con una pipetta automatica provvista di puntale con apertura adeguata. Si centrifuga in tubi da centrifuga da 15 mL a 8000 giri/min per 8 minuti oppure si filtra su filtri Whatman n.42.
Sull'estratto limpido si determina il contenuto di azoto nitrico

5. Espressione dei risultati

I risultati vengono espressi in µg di $N\text{-}NO_3^-$ h^{-1} g^{-1} di suolo seccato in stufa a 105°C.
Alcuni consigliano di determinare anche la concentrazione di $N\text{-}NO_2^-$ e di sommare questo valore a quello dell'azoto nitrico al fine di calcolare la velocità di nitrificazione.

Metodo III.1.3.

Misura del potenziale nitrificante sulla sospensione del suolo (*b*)

1. Principio

Tale metodo prevede l'incubazione per 6 ore di campioni di suolo trattati con una soluzione (*soil slurry*) contenente fosforo, ammonio e sodio clorato. In presenza di clorato la quantità di nitrito che si accumula corrisponde alla quantità di azoto ammoniacale ossidato. Il contenuto di nitriti viene misurato sulla sospensione del suolo prelevata ad intervalli di tempo prestabiliti.

2. Reattivi

Nel corso dell'analisi si utilizzano acqua distillata e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

2.1. Potassio cloruro, KCl, soluzione 4 mol/L: in un becher da 1000 mL si sciolgono 298 g di KCl con circa 700 mL di acqua. Si travasa in un matraccio tarato da 1000 mL e quindi si porta a volume con acqua.

2.2. Fosfato bipotassico, K_2HPO_4, soluzione 0,2 mol/L: in un becher da 100 mL si sciolgono 3,484 g di K_2HPO_4 con circa 70 mL di acqua. Si travasa in un matraccio tarato da 100 mL e quindi si porta a volume con acqua.

2.3. Fosfato monopotassico, KH_2PO_4, soluzione 0,2 mol/L: in un becher da 100 mL si sciolgono 2,722 g di KH_2PO_4 con circa 70 mL di acqua. Si travasa in un matraccio tarato da 100 mL e quindi si porta a volume con acqua.
2.4. Soluzione stock A: si prelevano 28 mL di soluzione di K_2HPO_4 e si introducono in un matraccio tarato da 100 mL, si aggiungono 72 mL di soluzione di KH_2PO_4 e si porta a volume con acqua.
2.5. Soluzione stock B: Sodio clorato, $NaClO_3$, soluzione 1M: in un becker da 100 mL si sciolgono 10,64 g di $NaClO_3$ con circa 70 mL di acqua Si travasa in un matraccio tarato da 100 mL e quindi si porta a volume con acqua.
2.6. Soluzione tampone a pH circa 7,2: si prelevano 10 mL della soluzione stock A e si introducono in un matraccio tarato da un litro. Si aggiungono 15 mL della soluzione stock B e 0,5 g di $(NH_4)_2SO_4$. Si porta a volume con acqua.

3. Apparecchiatura
Corrente attrezzatura da laboratorio e in particolare:
3.1. Centrifuga.
3.2. Agitatore oscillante (175 rpm).
3.3. Camera termostatica.

4. Procedimento
4.1. *Incubazione*
Si pesano 25 g di suolo fresco in una beuta da 250 mL e si aggiungono 100 mL di soluzione tampone a pH 7,2. Si chiude la beuta e si agita per 6 ore a 25°C.

4.2. *Campionamento*
Dopo 2 e 6 ore si prelevano, nel momento in cui cessa l'agitazione, in modo da mantenere costante il rapporto suolo: soluzione, 2 mL della sospensione in un tubo da centrifuga e si aggiungono 2 mL di KCl.
Si centrifuga a 3000 giri/min per 2 minuti, se necessario si filtra con carta Whatman n. 42.
Sull'estratto limpido si determina il contenuto di $N\text{-}NO_2^-$.

5. Espressione dei risultati
I risultati vengono espressi in ng di $N\text{-}NO_2^-$ min^{-1} g^{-1} di suolo seccato in stufa a 105°C.

Note

Se la determinazione del contenuto di $N\text{-}NO_2^-$ richiede una maggiore quantità di estratto, si consiglia di utilizzare 10 mL di *slurry* per ogni campionamento e di prelevare il surnatante dopo sedimentazione. In questo caso, la centrifugazione o la filtrazione potrebbero non essere necessarie.
Se non è possibile effettuare immediatamente l'analisi gli estratti devono essere conservati in frigorifero a 4-8°C per non più di 24 ore. Si consiglia di non congelare gli estratti.
Se vengono utilizzati fanghi il contenuto di ossigeno dello *slurry* potrebbe essere limitante; in questo caso occorre aerare i contenitori o aggiungervi direttamente ossigeno.

6. Note
I nitrati negli estratti di suolo possono essere determinati per via colorimetrica, per distillazione in corrente di vapore o mediante l'uso di un elettrodo specifico.
Per la dettagliata descrizione dei metodi di determinazione, rimando al Manuale di Metodi Chimici della medesima collana.

Metodi III.2.

ATTIVITÀ AMMONIFICANTE POTENZIALE

1. Oggetto

Il presente documento fissa i metodi per la determinazione della attività ammonificante del suolo.

Metodo III.2.1.

Metodo della piastra di terra

1. Principio

Il metodo si basa sull'aggiunta ad un campione di suolo di una quantità nota di sostanza azotata proteica misurandone ogni giorno la quantità di ammoniaca liberata nell'atmosfera.

2. Reattivi

2.1. Polvere di sangue essiccato;
2.2. acido solforico N/50;
2.3. idrossido di sodio N/50.

3. Procedimento

Distribuire sul fondo di una piastra Petri di 10 cm di diametro senza coperchio 50 g di suolo e 0.5 g di polvere di sangue essiccato. Aggiungere 12 mL di acqua (25% di umidità). Porre la piastra Petri in una di dimensioni maggiori (15 cm di diametro). Versare nella piastra più grande 10 mL di acido solforico N/50 esattamente misurati e qualche goccia di rosso di metile come indicatore di viraggio. Chiudere la piastra grande con il suo coperchio ed incubare a 28°C. Ripetere tre volte ciascuna determinazione. Ogni giorno titolare la quantità di ammoniaca liberata nel seguente modo:
- levare dalla piastra più grande quella contenente il suolo;
- sciacquare al di sopra della piastra grande il fondo di quella più piccola con una spruzzetta;
- titolare l'acido solforico con della soda N/50;
- scolare e rimpiazzare i 10 mL di acido solforico N/50 per la titolazione del giorno dopo.

Si incuba per un periodo di 12 giorni (di solito la produzione dell'ammoniaca alla fine di questo periodo è molto debole).

4. Espressione dei risultati

Si traccia una curva dello sviluppo quotidiano di ammoniaca su un foglio di carta millimetrata riportando sull'ascisse il tempo (giorni) e sulle ordinate la quantità di ammoniaca titolata (millilitri di soda N/50 oppure azoto od ammoniaca). La curva di ammonificazione ha il suo massimo in genere intorno al 5° giorno.

In modo analogo si calcola la quantità totale di ammoniaca liberata durante tutta la durata dell'esperimento.

Metodo III.2.2.

Metodo della caseina lattica

1. Principio

Il metodo si basa sull'aggiunta al suolo di una macromolecola proteica la cui mineralizzazione coinvolge tutti i microrganismi ammonizzanti. In particolare un campione di suolo viene incubato per 6 settimane in presenza di un eccesso di caseina lattica. Il suolo viene lisciviato ad intervalli di tempo definiti e l'azoto ammoniacale determinato colorimetricamente.

2. Reattivi

2.1. Soluzione satura di $CaSO_4$;

2.2. soluzione nutritiva esente da azoto (0.002 M $CaSO_4$*$2H_2O$, 0.005 M $Ca(H_2PO_4)$, 0.0025 M K_2SO_4, 0.002 M $MgSO_4$).

3. Procedimento

Il suolo (50 g), miscelato in parti uguali con sabbia di quarzo e disposto in buchner (diametro esterno di 13 cm) su uno strato di circa 2 cm, viene incubato alla temperatura di 30°C ± 0.5 ed al 60% della WHC previa aggiunta di azoto nella quantità di 250 mg/kg sotto forma di caseina lattica. Mantenendo costante l'umidità, ad intervalli di tempo di 7 giorni si procede a lisciviare il suolo con 900 mL di una soluzione satura di CaSO4 e, successivamente, a reintegrare gli elementi nutritivi trattando il terreno con 100 mL di una soluzione esente da azoto (0.002 M $CaSO_4$*$2H_2O$, 0.005 M $Ca(H_2PO_4)$, 0.0025 M K_2SO_4, 0.002 M $MgSO_4$).

Nei percolati viene determinato, per via colorimetrica, sia l'azoto nitrico (che dovrebbe risultare in tracce) che quello ammoniacale. La durata dell'incubazione è di 6 settimane. Parallelamente viene allestita una prova in bianco del tutto analoga alla precedente fatta eccezione per l'aggiunta della caseina lattica.

4. Espressione dei risultati

La quantità di ammonio proveniente dall'ammonizzazione della sostanza organica endogena del suolo (detta "A" ed espressa in mg di azoto per g di suolo) dovrà essere sottratta di volta in volta dalla quantità sviluppata dalla tesi con aggiunta di caseina lattica (detta "B") secondo la seguente formula:

$$\% \ NH_4^+ / (g \ suolo \times 7 \ giorni) = \frac{B - A}{250} \times 100$$

Metodo III.2.3.

Metodo dell'arginina

1. Principio

Tale metodo, utilizzato adottando delle modifiche tecniche minori, si basa, come il precedente, sull'aggiunta al suolo di una quantità nota di sostanza organica azotata in eccesso e misurando la quantità di ammoniaca prodotta dopo incubazione.

2. Reattivi

2.1. Soluzione di arginina allo 0.2%. Sciogliere 2 g di arginina in 1000 mL di acqua distillata. Conservare in frigorifero a +4°C;

2.2. soluzione di KCl 2M. Sciogliere 149.1 g di KCl in 1000 mL di acqua distillata.

3. Procedimento

In 3 bottiglie di polietilene da 150 mL si pesano il corrispettivo di 10 g di suolo secco all'aria, si aggiungono 2.5 mL di arginina allo 0.2% e si incubano a 33°C per 2-3 ore prima di congelare. Ripetere l'operazione inoculando altri 3 sottocampioni con 2.5 mL di acqua distillata. Si scongelano i campioni, si estraggono con 50 mL di KCl 2M,si agita per 1 ora, si filtra su Whatman N° 42 e si conserva in frigorifero a +4°C. E' prevista la determinazione, a parte, del contenuto in acqua dei campioni.

4. Espressione dei risultati

Il contenuto in NH_4^+ scambiabile può essere determinato colorimetricamente e esprime i risultati secondo la seguente espressione:

$$\mathrm{mgNH_4^+/(g\ suolo \times ora)} = \frac{(\mathrm{NH_4^+ - C - NH_4^+ - B}) \times (\mathrm{ml\ KCl + ml\ Arg + ml\ H_2O\ campione})}{\mathrm{g\ suolo \times ore\ incubazione}}$$

Metodo III.3.

RESPIRAZIONE DEL SUOLO INDOTTA DALL'AGGIUNTA DI SUBSTRATO (METODO SIR)

1. Oggetto
Il presente documento fissa un metodo per la determinazione della respirazione del suolo.

2. Principio
Il metodo si basa sulla determinazione della respirazione del suolo mediante il consumo di ossigeno o la produzione della CO_2 immediatamente dopo l'aggiunta di substrato a concentrazioni saturanti. Il SIR è calibrato utilizzando uno dei metodi della fumigazione per la determinazione della biomassa microbica.

3. Procedimento
La determinazione del SIR può essere eseguita seguendo tecniche diverse riportate in letteratura da vari autori e di seguito descritte.
In linea generale il metodo SIR prevede le seguenti fasi:
- preparazione del campione;
- aggiunta al suolo della concentrazione saturante di glucosio in soluzione o in polvere ed omogeneizzazione del substrato nel suolo. Se il glucosio è utilizzato in polvere si aggiunge un materiale inerte (talco) per facilitarne la dispersione;
- incubazione del suolo (generalmente a 25°C) per un periodo di 5-6 ore;
- determinazione della respirazione massima iniziale seguendo una delle tecniche riportate di seguito;
- calcolo dell'aliquota di CO_2 prodotta per ora di incubazione per 100 grammi di suolo (peso secco) e calcolo della biomassa microbica equivalente alla respirazione massima iniziale utilizzando l'equazione descritta in (4).

3.1. *Preparazione del campione*
Il campione di suolo viene setacciato (< 2 mm) per eliminare i residui delle radici e la macrofauna presente. Il setacciamento rende il suolo maggiormente omogeneo facilitando sia la dispersione del glucosio sia il rilascio della CO_2 evoluta.
La stima del SIR in suoli seccati all'aria non risulta corretta in quanto una parte della biomassa microbica potrebbe essere inattivata o uccisa. In suoli naturalmente secchi o con un basso contenuto di umidità è comunque possibile applicare il metodo SIR per la stima della biomassa microbica senza dover ricorrere all'umidificazione o alla pre-incubazione.

3.2. *Aggiunta al suolo della concentrazione saturante di glucosio in soluzione o in polvere*
L'aggiunta del substrato può avvenire utilizzando il glucosio in soluzione o in polvere. In quest'ultimo caso il glucosio viene disperso in talco (0.5 g di talco per 100 g di suolo) al fine di rendere più omogenea la concentrazione del glucosio nel suolo. La concentrazione ottimale di

glucosio da aggiungere al suolo deve essere stabilita di volta in volta eseguendo degli esperimenti preliminari; la concentrazione ottimale di glucosio è generalmente compresa tra 1 e 8 mg g^{-1} a seconda delle tipologie di suolo. Se il substrato è disciolto in acqua la concentrazione della soluzione varia da 8 a 30 mg mL^{-1}.

3.3. *Incubazione del suolo*

Un'aliquota di suolo pari a 1 g di suolo secco, al quale è stato aggiunto il substrato, viene posta in un recipiente di vetro che a sua volta è inserito in bottiglie il cui volume è di 28-30 mL o in siringhe con un volume di 60 ml. Le bottiglie o le siringhe, chiuse ermeticamente per impedire gli scambi gassosi con l'atmosfera, vengono incubate a 25°C per circa 5-6 ore dopo l'aggiunta del substrato.

3.4. *Determinazione della respirazione massima iniziale*

Le determinazioni della CO_2 sono eseguite sia sui suoli a cui non è stato aggiunto il substrato (controllo) sia sui suoli lasciati incubare per 5-6 ore dall'aggiunta di glucosio.
Per la determinazione della CO_2 possono essere utilizzate varie apparecchiature, le più comunemente utilizzate sono:
3.4.1. gas cromatografo (GC);
3.4.2. sistema a flusso di aria;
3.4.3. respirometro (Sapromat);
3.4.4. ultragas 3 (Wosthoff) analizzatore di CO_2;
3.4.5. analizzatore ad infrarossi.

3.4.1. *Gas cromatografia*

La determinazione della CO_2 mediante l'uso della tecnica della gas cromatografia è semplice e veloce e consente di leggere circa 40 campioni per ora.
Il campione di gas prelevato dallo spazio di testa mediante una siringa è generalmente di 1 mL. I gas cromatografi hanno la fase stazionaria costituita da colonne Poropak (T, Q) in acciaio inossidabile di 1.5-2.2 m, diametro interno di 1-2 mm e utilizzano come gas di trasporto l'elio (He). I detector per la determinazione della CO_2 sono generalmente quelli a termoconducibilità (TCD). La calibrazione dello strumento è eseguita mediante l'uso di standard di CO_2 a concentrazione nota.

3.4.2. *Sistema a flusso di aria*

Il sistema per la determinazione della CO_2 consiste in un apparato costituito da beute (125 mL) contenenti 30 g di suolo, all'interno delle quali viene insufflata aria priva di CO_2. Il gas in uscita dalle beute (flusso pari a 50-80 mL min^{-1}) viene fatto passare attraverso 50 mL di NaOH 10-20 mM in modo che la CO_2 liberata dal suolo possa essere trasportata dalla corrente di aria e catturata dalla soluzione alcalina. Si aggiungeil glucosio in soluzione portando il suolo al 120 % della capacità di campo in quantità pari a 8 mg g^{-1} di suolo. La quantità di CO_2 catturata dalla soluzione di NaOH fu determinata, previa precipitazione dei carbonati con l'aggiunta di $BaCl_2$, mediante la titolazione a pH 8.6 con HCl a molarità nota ed utilizzando come indicatore di pH la fenolftaleina.

3.4.3. *Respirometro (Sapromat)*

I respirometri sono considerati sistemi di misura migliori rispetto ai sistemi statici della gas cromatografia nelle determinazioni su suoli alcalini. Infatti, a seguito della cattura della CO_2 in soluzione alcalina il sistema provvede alla misurazione sia del consumo di O_2 sia della produzione di CO_2, così come è stato descritto nello specifico capitolo relativo alla respirazione del suolo.
Si Utilizzano 0.5 g di suolo posti in un volume di 19 mL e 0.3 mL di KOH 5 M per intrappolare la CO_2 prodotta. 1 mL di glucosio è aggiunto al suolo in soluzione (30 mg mL^{-1}) e la respirazione è misurata ogni 30 minuti leggendo direttamente le variazioni di pressione al micromanometro.

3.4.4. *Ultragas 3 (Wosthoff) analizzatore di CO_2*

Lo strumento l'Ultragas 3 (Wosthoff), analizzatore di CO_2, consente di sottrarre la CO_2 dall'ambiente in cui è stata prodotta mediante una corrente di aria, dopo di che la CO_2 viene catturata da una soluzione di NaOH 0.04 N. La conducibilità della soluzione alcalina varia in funzione della quantità di CO_2 catturata e pertanto le letture di conducibilità dopo essere state registrate vengono automaticamente convertite in concentrazione di CO_2.
La quantità di suolo necessaria per ogni campione è di circa 100 g a cui viene aggiunto il glucosio in polvere mescolato con talco nel rapporto di 1:3. Il suolo e il substrato vengono omogeneizzati assicurando una distribuzione uniforme del glucosio nel suolo. I campioni da analizzare vengono posti in provette di plastica (25 x 4 mm) chiuse con tappi di poliuretano e collegate con l'analizzatore di CO_2.
Il flusso di aria priva di CO_2 è intermittente (ogni ora, per circa 20 minuti) e il tasso di respirazione viene misurato per 10 minuti.

3.4.5. *Analizzatore ad infrarossi*

L'analizzatore di gas a infrarossi è un metodo per la determinazione della CO_2 molto sensibile ed è stato utilizzato anche per la determinazione della respirazione del suolo.

4. Espressione dei risultati

La differenza tra la respirazione dopo 5-6 ore di incubazione dei suoli a cui è stato aggiunto glucosio e quella basale (controllo) è espressa come μmol CO_2 g^{-1} suolo secco h^{-1}.

$$x = (x_6 - x_0)/ h$$

dove
x = mL di CO_2 100 g^{-1} h^{-1} (respirazione indotta dall'aggiunta di substrato-SIR);
x_6 = mL di CO_2 dopo 6 ore di incubazione dall'aggiunta di substrato;
x_0 = mL di CO_2 relative alla respirazione basale (controllo);
h = ore di incubazione (5 o 6).

Metodi IV.1.

ATTIVITÀ UREASICA DEI SUOLI

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione della attività ureasica del suolo.

Metodo IV.1.1.

Determinazione mediante la misura dell'urea non consumata

1. Principio
Il metodo di determinazione prevede l'incubazione, per un tempo prefissato, di un campione di suolo con una soluzione non tamponata di urea e la misura della quantità di urea non trasformata mediante determinazione colorimetrica.
L'incubazione va effettuata in assenza di un batteriostatico.

2. Reattivi
Utilizzare acqua bidistillata o ultrapura e reagenti di grado analitico:

2.1. soluzione di urea 2 mg mL^{-1} in acqua: sciogliere 2.0 g di urea in circa 700 mL di acqua, e portare a volume finale di 1 litro con acqua;

2.2. soluzione di acetato di fenilmercurio (PMA) 50mg L^{-1} in acqua;

2.3. soluzione di fenilmercurio acetato e cloruro potassico (KCl-PMA) (2 M KCl-5 mg L^{-1} PMA): sciogliere 1.5 g di KCl in 9 litri di acqua e aggiungere 1 litro di soluzione di PMA (2.2.);

2.4. soluzione di diacetilmonossima (DAM): sciogliere 2.5 g di DAM in 100 mL di acqua;

2.5. soluzione di tiosemicarbazide (TSC): sciogliere 0.25 g di TSC in 100 mL di acqua;

2.6. soluzione acida: aggiungere 300 mL di acido fosforico (H_3PO_4) all'85% e 10 mL di acido solforico concentrato (H_2SO_4) a 100 mL di acqua e portare a volume finale di 500 mL con acqua;

2.7. soluzione colorante: mescolare immediatamente prima dell'uso 25 mL di soluzione di diacetilmonossima (2.4.) e 10 mL di soluzione di tiosemicarbazide (2.5.) con 500 mL di reagente acido (2.6.);

2.8. soluzione standard di urea (250 mg/mL: sciogliere 0.5 g di urea in circa 1500 mL di soluzione di KCl-PMA (2.3.), e diluire a 2 litri con la stessa soluzione. Tale soluzione contiene 250 µg di urea mL^{-1}, se l'urea utilizzata è pura.

Tutti i reattivi sono stabili per parecchie settimane se conservati a 4°C in frigorifero, tranne il reattivo colorante (2.7.) che deve essere preparato immediatamente prima dell'uso.

3. Apparecchiatura
Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:
3.1. beute tarate da 50 mL, provviste di tappo di vetro;
3.2. bagno termostatico;
3.3. bagnomaria bollente;
3.4. imbuti filtranti da vuoto (di polietilene);
3.5. spettrofotometro o colorimetro.

4. Procedimento
4.1. *Saggio di attività*
Incubare in una bottiglia di vetro chiusa 5 g di suolo umido cioè non seccato all'aria, preventivamente setacciato (<2 mm sulla base di un campione seccato in stufa), con 5 mL di soluzione di urea 2 mg mL^{-1} (10 mg di urea) per 5 ore a 37°C in bagno termostatico. Alla fine dell'incubazione, rimuovere il tappo e aggiungere 50 mL di reagente 3. Chiudere di nuovo la bottiglia e agitare per 1 ora. Filtrare la sospensione di suolo, sotto vuoto, utilizzando un filtro di carta Whatman n. 42.
Effettuare il saggio in tre repliche.

4.2. *Determinazione colorimetrica dell'urea*
Pipettare una aliquota (1-2 mL) di estratto ottenuto dopo filtrazione, contenente al massimo 200 µg di urea in una beuta tarata da 50 mL, portare a un volume di 10 mL con la soluzione KCl-PMA, e aggiungere 30 mL della soluzione colorante (2.7.). Agitare vigorosamente per alcuni secondi per mescolare bene i componenti e porre in bagnomaria bollente. Dopo 30 minuti di incubazione, raffreddare immediatamente la beuta sotto acqua corrente per almeno 15 minuti (o ponendo in bagno di acqua fredda a 12-20°C). Portare il volume a 50 mL con acqua e mescolare accuratamente. Misurare l'intensità della colorazione rossa prodotta a 500-550 nm (il massimo di assorbimento è riportato a 527 nm) con lo spettrofotometro (nel caso che venga usato un colorimetro usare un filtro verde n. 54).

4.3. *Preparazione di una curva di calibrazione*
Diluire 10 mL di soluzione standard di urea (2.8.) a 100 mL con la soluzione (KCl-PMA) (2.3.) in una beuta tarata e mescolare accuratamente. Pipettare, poi, 0, 1, 2, 4, 6, e 8 mL di tale soluzione in tante beute tarate da 50 mL, aggiustare il volume a 10 mL la soluzione KCl PMA e procedere esattamente come descritto precedentemente per la determinazione dell'urea nell'estratto di suolo. I vari campioni conterranno rispettivamente 0, 25, 50, 100, 150 e 200 µg di urea.

5. Espressione dei risultati
L'attività ureasica si esprime in quantità (g o moli) di urea idrolizzata da 1 g di suolo in 1 ora di incubazione.
Calcolare la quantità di urea rimasta (A) mediante la curva di calibrazione preparata utilizzando la soluzione standard di urea. La quantità di urea idrolizzata da 1 g suolo in 1 ora di incubazione sarà data dalla differenza fra i g di urea inizialmente aggiunti (10 g) e quelli misurati nell'estratto (A), il tutto diviso per 5 (g di suolo incubati) e ancora per 5 (ore totali di incubazione).

$$\text{Attività ureasica} = (10\text{-A})/5 \times 5$$

Metodo IV.1.2.

Determinazione mediante misura dell'ammoniaca prodotta

1. Principio

Il metodo di determinazione prevede l'incubazione per un tempo prefissato di un campione di suolo con una soluzione non tamponata o tamponata di urea. Sul filtrato del campione si effettua la misura della quantità di ammoniaca prodotta mediante determinazione colorimetrica.
L'incubazione va effettuata in assenza di un batteriostatico.
L'ammoniaca formatasi reagisce con il sodio salicilato in presenza di sodio dicloroisocianurato e in condizioni alcaline forma un complesso stabile di colore verde. La presenza del sodio nitroprussiato nella miscela di incubazione agisce da catalizzatore e aumenta la sensibilità del metodo di circa 10 volte.

2. Reattivi

Utilizzare acqua bidistillata o ultrapura e reagenti di grado analitico:
2.1. soluzione concentrata di urea (0.72 M) in acqua: sciogliere 43.2 g di urea in circa 700 mL di acqua, e portare a volume finale di 1 litro con acqua;
2.2. soluzione diluita di urea (0.08 M) in acqua: sciogliere 4.8 g di urea in 700 mL di acqua e portare a volume finale di 1 litro con acqua oppure diluire la soluzione 0.72 M alla molarità finale 0.08 M (fattore di diluizione 9);
2.3. soluzione di cloruro potassico e acido cloridrico (1 N KCl-0.01 N HCl): sciogliere 74.56 g di KCl in 1 litro di 0.01 N HCl;
2.4. tampone borato pH 10: mescolare 50 mL di 0.025 M $Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$ (9.525 g L^{-1}) con 18.3 mL di NaOH 0.1 M e diluire a 100 mL con acqua;
2.5. soluzione di sodio salicilato: mescolare al momento dell'uso 100 mL di sodio nitroprussiato 0.12% (1.2 g L^{-1}), 100 mL di sodio salicilato 17% (170 g L^{-1}) e 100 mL di acqua distillata;
2.6. soluzione di dicloroisocianurato sodico 0.1%: sciogliere 1 g di dicloroisocianurato sodico in 1 litro di acqua;
2.7. soluzione standard di NH_4Cl (NH_4^+-N, 1 mg mL^{-1}): sciogliere 3.8207 g di NH_4Cl in 1 litro di acqua.

3. Apparecchiatura

Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:
3.1. beute tarate da 100 mL, provviste di tappo di vetro;
3.2. bagno termostatico;
3.3. agitatore meccanico;
3.4. imbuti filtranti da vuoto (di polietilene);
3.5. spettrofotometro o colorimetro.

4. Procedimento

4.1. *Saggio di attività*

a) Saggio in assenza di tampone: 5 g di suolo (campioni di suolo fresco-umido preventivamente setacciati (<2 mm) e conservati in buste di polietilene a 4°C) vengono posti in beute da 100 mL e umettati con 2.5 mL di soluzione 0.08 M di urea (2.2.). Le beute, chiuse con tappo di vetro, vengono incubate per 2 ore a 37°C in bagno termostatico. Dopo incubazione, i tappi vengono rimossi e ai campioni vengono aggiunti 50 mL di soluzione KCl/HCl (2.3.) e le miscele vengono tenute in agitazione su agitatore meccanico per almeno 30 minuti. Le risultanti sospensioni sono poi filtrate sotto vuoto usando filtri di carta Whatman n. 42. Sui filtrati si effettua la determinazione colorimetrica dell'ammoniaca.
Il saggio va effettuato in triplicato.

b) Saggio in presenza di tampone: A 5 g di suolo, posti in beute da 100 mL, vengono aggiunti 2.5 mL di soluzione concentrata di urea 0.72 M (2.1.) e 20 mL di tampone borato pH 10.0 (2.4.). I campioni vengono incubati per 2 ore a 37°C, trattati con 30 ml di soluzione di KCl/HCl (2.3.) e successivamente filtrati come descritto precedentemente. I filtrati ottenuti vengono poi analizzati per il contenuto di ammoniaca. Il saggio va effettuato in triplicato

Per ambedue i metodi si allestiscono campioni di controllo incubando il suolo con 2.5 mL di acqua distillata e aggiungendo urea alla fine dell'incubazione e immediatamente prima dell'aggiunta della soluzione KCl/HCL.

4.2. *Determinazione colorimetrica dell'ammoniaca*

1 mL di filtrato viene diluito a 10 mL con acqua distillata e si aggiungono in successione 5 mL della soluzione di sodio salicilato (2.5.) e 2 mL di soluzione di sodio dicloroisocianurato (2.6.). Si incuba a temperatura ambiente per 30 minuti e si legge l'assorbanza a 690 nm. Il colore è stabile per almeno 8 ore a temperatura ambiente.

4.3. *Preparazione di una curva di calibrazione*

La standardizzazione del metodo si effettua allestendo una curva di calibrazione utilizzando la soluzione standard di NH_4Cl. Campioni contenenti 0, 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 µg per mL di NH_4^+-N vengono sottoposti al procedimento prima descritto.

5. Espressione dei risultati

L'attività ureasica si esprime in quantità (g o moli) di ammoniaca prodotta da 1 g di suolo in 2 ore di incubazione.
Calcolare la quantità di ammoniaca prodotta mediante la curva di calibrazione preparata utilizzando la soluzione standard di cloruro di ammonio. Nel calcolo vanno considerate le diluizioni operate per l'estrazione dell'ammoniaca e successiva determinazione colorimetrica.

Metodi IV.2.

ATTIVITÀ PROTEOLITICA DEL SUOLO

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione dell'attività proteolitica del suolo.

Metodo IV.2.1.

Attività proteasica verso substrati di alto peso molecolare

1. Principio
Il metodo si basa sulla determinazione di amminoacidi rilasciati dopo incubazione del suolo in presenza di caseina.

2. Reattivi
2.1. Soluzione tampone (Tris 50 mM a pH 8.1). Si sciolgono 6.05 g di Tris (idrossimetil) amminometano in 700 mL di acqua distillata e quindi si aggiusta il valore di pH della soluzione a 8,1 con una soluzione di HCl; si diluisce infine ad 1 l con acqua distillata;
2.2. soluzione di caseina. Si sospendono 10 g di caseinato sodico in acqua distillata calda (circa 50°C) e dopo agitazione per almeno 1 ora si porta a 500 mL con acqua distillata. Se si dispone di caseina si consiglia di sospendere 10 g del composto in tampone tris (1) e di portare eventualmente il valore di pH a 8,1 con una soluzione di NaOH; dopo aver agitato la sospensione per almeno 1 ora si porta a 500 mL con tampone tris;
2.3. soluzione di acido tricloroacetico. Si sciolgono 75 g di acido tricloroacetico (TCA) in circa 300 mL di acqua distillata e quindi si diluisce a 500 mL con acqua distillata;
2.4. soluzione di carbonato sodico. Si sciolgono 50 g di Na_2C0_3 in 60 mL di una soluzione di NaOH 1N che sono stati in precedenza diluiti con acqua distillata; infine si diluisce ad 1 L;
2.5. soluzione di solfato rameico. Si sciolgono 0,5 g di $CuSO_4.5H_2O$ in acqua distillata e si porta il volume della soluzione a 100 mL con acqua distillata;
2.6. soluzione di tartrato sodico. Si scioglie 1 g di tartrato sodico ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) in acqua distillata e si diluisce a 100 mL con acqua distillata;
2.7 soluzione di carbonato sodico, solfato rameico e tartrato sodico. Si diluiscono 1000 mL della soluzione di carbonato (4) con 20 mL della soluzione 5 e con 20 mL della soluzione 6;
2.8. soluzione di Folin-Ciocalteau. Si diluiscono 167 mL del reagente di Folin con 500 mL di acqua distillata. La soluzione è instabile e deve essere preparata immediatamente prima dell'uso;
2.9. soluzione standard di tirosina. Si sciolgono 50 mg di tirosina in circa 70 mL di tampone tris (soluzione) e si diluisce a 100 mL con tampone tris.

3. Apparecchiatura
3.1. Spettrofotometro;
3.2. bagno ad acqua con dispositivo per agitare e controllare la temperatura;
3.3. centrifuga.

4. Procedimento

4.1. *Saggio di attività*

Si pone 1 g di suolo fresco in un tubo da centrifuga e quindi si aggiungono 5 mL di tampone Tris e 5 mL della soluzione di caseina. Dopo aver tappato il tubo da centrifuga, si mescola il contenuto e si incuba per 2 ore a 50°C sotto agitazione in un bagno termostatato. Alla fine della incubazione si aggiungono 5 mL di TCA e si agita il contenuto. Per la preparazione del controllo si segue lo stesso protocollo sperimentale della prova con la sola eccezione di aggiungere la soluzione di caseina alla fine della incubazione ed immediatamente prima dell'aggiunta di TCA. Si consiglia di replicare il saggio. Quindi si centrifuga la sospensione (10.000-20.000 g) per 10 minuti.

4.2. *Determinazione colorimetrica degli aminoacidi*

Vengono aggiunti 5 mL del surnatante a 7,5 mL della soluzione di carbonato sodico, solfato rameico e trartrato sodico; si incuba per 15 minuti a temperatura ambiente e poi si aggiungono 5 mL della soluzione di Folin. Si filtra la sospensione e dopo un'ora si determina la densità ottica a 700 nm; si consiglia di eseguire diverse determinazioni prima di ottenere un valore costante.

4.3. *Preparazione della curva di taratura*

Si pipettano 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL della soluzione di tirosina in palloni volumetrici della capacità di 10 mL; si aggiungono 5 mL della soluzione di caseina in ciascun pallone volumetrico e quindi si porta a volume con il tampone tris. Si determina la densità ottica come descritto in precedenza.

5. Espressione dei risultati

L'attività proteasica si esprime in quantità (g) di tirosina prodotta da 1 g di terreno secco in 2 ore di incubazione.

Si sottrae la densità ottica del controllo da quella delle prove e si calcola la quantità di tirosina prodotta mediante la curva di calibrazione preparata utilizzando la soluzione standard di tirosina.

Dopo si calcola l'attività proteasica del campione di suolo secondo la seguente formula:

$$\mu\text{g tirosina/g terreno secco/2 ore} = \frac{\text{C x 15}}{\text{peso secco di 1 g di suolo}}$$

dove 15 rappresenta il volume finale della soluzione dopo l'aggiunta del TCA e C è la concentrazione di tirosina determinata sulla curva di calibrazione.

Metodo IV.2.2.

Determinazione dell'attività proteasica verso un substrato a basso peso molecolare

1. Principio

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ammoniaca liberata per catalisi di un derivato dipeptidico (N-α-benzoil-L-argininamide, BAA) mediante misure potenziometriche.

Il metodo può essere applicato per tutti i tipi di suolo, compresi quelli fortemente organici.

2. Reattivi

2.1 Tampone K_2HPO_4/KH_2PO_4 0.1 M pH 7.00:
2.2. soluzione A: disciogliere g 27.8 di KH_2PO_4 in 1000 mL di acqua deionizzata;
2.3. soluzione B: disciogliere g 53.65 di $K_2HPO_4 . 7H_2O$ o g 71.7 di K_2HPO_4 $12H_2O$ in 1000 mL;
2.4. miscelare 390 mL di A con 610 mL di B e diluire a 2000 mL: pH 7.00;
2.5. NaOH 10 M: sciogliere 40 g di idrossido di sodio (NaOH, esente da ammoniaca) in 80 mL di acqua deionizzata, lasciare raffreddare e diluire a 100 mL;
2.6. (substrato): N-α-benzoil L-argininammide idrocloruro monoidrato 0.03 M. Il substrato deve essere conservato a 4°C (stabile per circa 2 settimane);
2.7. KCl 2 M: sciogliere 149.1 g di sale anidro in 1000 mL di acqua;
2.8. soluzione concentrata di NH_4Cl 1000 mg/L; pesare, con l'approssimazione di +/- 1 mg, 3.819 g di cloruro di ammonio anidro (NH_4Cl) seccato a 110°C, sciogliere in acqua e diluire ad 1 litro;
2.9. soluzione standard di NH_4Cl 10 mg/mL. Dalla soluzione concentrata di cloruro ammonio si prepara per diluizione una soluzione a 10 mg/L e una a 1 mg/L per tarare lo strumento.

3. Apparecchiatura

3.1. Potenziometro munito di elettrodo selettivo per ammoniaca;
3.2. bagno (ad acqua) oscillante, riscaldato e termostatato;
3.3. agitatore magnetico;
3.4. pH-metro;
3.5. vetreria da laboratorio.

4. Procedimento

È preferibile, come in tutti i saggi enzimatici eseguire prove in triplo, compreso i controlli.

4.1. Saggio di attività

Il suolo (1g) viene posto in un beaker da 25 mL; si aggiungono 4 mL di tampone fosfato e 1 mL di substrato. Nel controllo si aggiunge solo tampone fosfato (il substrato si aggiunge dopo l'incubazione, prima della determinazione di ammoniaca). Si pone ad incubare in bagno termostatato per 2 ore a 40°C; è necessario tappare con "parafilm" o altro per impedire l'evaporazione del solvente. Si toglie dal bagno e si aggiungono 4 mL di KCl 2M (volume finale 10 mL). Si eseguono le determinazioni di ammoniaca liberata dalla idrolisi enzimatica del BAA direttamente nei recipienti di incubazione contenenti suolo e 10 mL di soluzione. La determinazione viene eseguita al potenziometro come qui di seguito riportato (taratura dello strumento).

4.2. *Taratura dello strumento*

E' preferibile l'uso di potenziometri provvisti della funzione "CONCENTRAZIONE" oltre che della scala dei mV, in quanto operativamente più semplici. Possono comunque essere utilizzati tutti gli elettrometri in grado di apprezzare variazioni di +/- 0.5 mV.

Prima dell'uso assicurarsi della efficienza dell'elettrodo selettivo e in particolare della integrità della membrana (attenersi al manuale di istruzione della ditta costruttrice). In generale i controlli da eseguire sono:
- pendenza della retta di taratura - concentrazione di NH_4^+ e potenziale (è funzione della temperatura);
- tempo di risposta (è funzione della concentrazione di ammoniaca);
- riproducibilità (intervallo di concentrazione con risposta lineare).

Si esegue la determinazione della soluzione standard 10 mg/L; si utilizzano circa 10 mL di soluzione in un beaker da 25 mL, si immerge per 3-5mm l'elettrodo nella soluzione, si agita con agitatore elettromagnetico (senza creare vortici), si aggiungono 0.1-0.2 mL di NaOH 10 M (pH intorno a 11). Si registrano i valori in mV corrispondenti a questa concentrazione di ammoniaca; si esegue quindi la determinazione del potenziale dato dalla soluzione avente la concentrazione di 1 mg/L. Le soluzioni ammoniacali che differiscono di un valore 10 in concentrazione danno approssimativamente pendenze di 57 mV a 18°C e 59 mV a 25°C.

Se si lavora con un apparecchio provvisto della funzione "CONC", si imposta il valore dello standard (p. es. 1 mg/L) a cui corrisponde un valore costante nel tempo in mV sulla scala dello strumento; si imposta la pendenza trovata nelle condizioni sperimentali e lo strumento è pronto per ulteriori determinazioni, che saranno date in concentrazione di NH_4^+ (mg/L). Se lo strumento non è provvisto della funzione "CONC", si riportano i valori in mV corrispondenti ai vari campioni su una retta di taratura che fornisce le concentrazioni di ammoniaca (mg/L) in corrispondenza dei valori di potenziale (mV).

Dopo 10 determinazioni circa, e osservando le istruzioni operative dello strumento, si deve controllare la concentrazione di uno standard e immergere l'elettrodo in una soluzione a pH 4 per rimuovere eventuale depositi di idrossidi colloidali od altro e sporcizia sulla membrana. Queste precauzioni sono prese a discrezione dell'operatore e compatibilmente con la velocità di "risposta" dell'elettrodo e del tipo di suolo in esame.

5. Espressione dei risultati

I valori di concentrazione di NH_4^+ (mg/L) misurati direttamente al potenziometro per i singoli campioni devono essere sottratti dei rispettivi controlli.

Quindi si calcola l'attività enzimatica in base alla seguente espressione:

$$\text{Attività enzimatica } (\mu\text{gN - NH}_4/\text{g h}^{-1}) = \frac{\mu\text{gN - NH}_4/\text{mL}}{\text{peso secco suolo x ore di incubazion e}} \text{ x 10 mL}$$

Metodi IV.3.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ FOSFATASICA DEL SUOLO

1. Oggetto
Il presente documento fissa i metodi per la determinazione dell'attività fosfatica del suolo.

Metodo IV.3.1.

Metodo per la determinazione della fosfomonoesterasi

1. Principio
Il principio del metodo per la determinazione delle fosfomono-esterasi consiste nel determinare spettrofotometricamente a 400 nm il *p*-nitrofenolo rilasciato quando il suolo è messo ad incubare con soluzioni tamponate di *p*-nitrofenilfosfato di sodio (fosfomonoesterasi) eventualmente in presenza di toluene come agente sterilizzante.

2. Reattivi
2.1. Tampone Universale Modificato (TUM-soluzione madre; vedi "Commenti"): sciogliere 12,1 g di tris(idrossimetil)amminometano, 11,6 g di acido maleico, 14,0 g di acido citrico e 6,3 g di acido borico in 488 mL di NaOH 1N, quindi diluire la soluzione ad un litro con H_2O distillata (conservare in frigorifero);
2.2. tampone Universale Modificato a pH 6,5 ed a pH 11,0 (TUM-6,5 e TUM-11): porre 200 mL di TUM-soluzione madre in un beker da 500 mL, portare il pH a 6,5 con una soluzione di HCl 0,1N e quindi diluire ad un litro con H_2O (TUM-6,5). Prelevare altri 200 mL di TUM-soluzione madre, portare a pH 11,5 con una soluzione di NaOH 0,1 N e quindi diluire ad un litro con H_2O (TUM-11);
2.3. *p*-Nitrofenil fosfato (p-NP) 0,025 M: in un matraccio da 50 mL solubilizzare 0,420 g di p-nitrofenil fosfato tetraidrato (sale bisodico) in 40 mL di TUM-6,5 per saggi di fosfomonoesterasi acida o in 40 mL di TUM-11 per saggi di fosfomonoesterasi alcalina, portare quindi a volume con il TUM utilizzato per la solubilizzazione;
2.4. cloruro di calcio 0,5 M: in un matraccio da un litro solubilizzare 73,5 g di $CaCl_2.H_2O$ con circa 700 mL di H_2O, quindi portare a volume con H_2O;
2.5. idrossido di sodio 0,5 M: in un matraccio da un litro sciogliere 20 g di NaOH con circa 700 mL di acqua, quindi portare a volume con acqua;
2.6. soluzione standard di p-nitrofenolo: sciogliere 1,0 g di p-nitrofenolo con circa 70 mL di H_2O, diluire ad un litro con H_2O (conservare in frigorifero).

3. Apparecchiatura
3.1. Spettrofotometro UV-VIS;
3.2. pHmetro.

4. Procedimento
Porre 1g di terreno in un matraccio da 50 mL, aggiungere 0,2 mL di toluene, 4 mL di TUM-6,5 per i saggi di fosfomonoesterasi acida o di TUM-11 per quelli di fosfomonoesterasi alcalina, ed 1 mL della soluzione contenente *p*-nitrofenil fosfato nello stesso tampone. Agitare per alcuni secondi, chiudere il matraccio e porlo in incubatore a 37 °C per un'ora. Bloccare la reazione mediante aggiunta di 1 mL di $CaCl_2$ 0,5 M e di 4 mL di NaOH 0,5 M. Agitare il tutto per alcuni secondi quindi filtrare la sospensione su un filtro a fascia blu (o Whatman n.2). Eseguire la lettura spettrofotometrica del filtrato a 400 nm contro un "bianco" costituito da tutti i reagenti tranne la soluzione del *p*-nitrofenil fosfato sostituendola con 1 mL del TUM appropriato. Contemporaneamente ai saggi di attività va eseguito un saggio di controllo con lo stesso procedimento, ma aggiungendo la soluzione di *p*-nitrofenil fosfato solo dopo aver aggiunto le soluzioni di $CaCl_2$ 0,5 M e di NaOH 0,5 M (cioè immediatamente prima della filtrazione della sospensione di terreno).
La concentrazione del *p*-nitrofenolo contenuto nel filtrato viene eseguito tramite una retta di taratura costruita con le densità ottiche di soluzioni standard contenenti 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg di *p*-nitrofenolo. (Preparare tali soluzioni diluendo 1 mL di soluzione di *p*-nitrofenolo 0,025 M a 100 mL con il TUM appropriato, e prelevando da questa soluzione aliquote di 0, 1, 2, 3, 4 e 5 ml. Dopo aver aggiustato il volume a 5 mL con H_2O addizionare a ciascuna soluzione 1 mL di $CaCl_2$ 0,5 M e 4 mL di NaOH 0,5 M, filtrare la sospensione ottenuta e sul filtrato eseguire la lettura spettrofotometrica a 400 nm).

5. Espressione dei risultati
I risultati sono espressi in termini di µg di *p*-nitrofenolo g^{-1} h^{-1}.

Metodo IV.3.2.

Metodo per la determinazione della fosfodiesterasi

1. Principio
Il principio del metodo per la determinazione delle fosfodiesterasi consiste nel determinare spettrofotometricamente a 400 nm il *p*-nitrofenolo rilasciato quando il suolo è messo ad incubare con soluzioni tamponate di bis-*p*-nitrofenilfosfato di sodio (fosfodiesterasi), eventualmente in presenza di toluene come agente sterilizzante.

2. Reattivi
2.1. Tampone tris-(idrossimetil)-amminometano 0,05 M a pH 8,0 (TRIS-8): sciogliere 6,1 g di tris-(idrossimetil)-amminometano in circa 800 mL di H_2O ed aggiustare il pH ad 8,0 con una soluzione di H_2SO_4 0,2 N, quindi diluire fino ad un litro;
2.2. bis-*p*-Nitrofenil fosfato (b-PNP) 0,005 M: sciogliere 0,1811 g di bis-*p*-nitrofenil fosfato di sodio con circa 80 mL di tampone TRIS-8, quindi diluire a 100 mL con il tampone (conservare in frigorifero);

2.3. soluzione estraente di tris-(idrossimetil)-amminometano-idrossido di sodio 0,1 M a pH 12 (TRIS-NaOH): sciogliere 12,2 g di tris-(idrossi-metil)-amminometano con circa 800 mL di H_2O ed aggiustare il pH a 12 con NaOH 0,5 N, quindi diluire ad un litro con H_2O;
2.4. cloruro di calcio 0,5 M: sciogliere 73,5 g di $CaCl_2.H_2O$ con circa. 700 mL di H_2O, quindi diluire fino ad un litro con H_2O;
2.5. soluzione di tris-(idrossimetil)-amminometano 0,1 M a pH 10 (TRIS-10): sciogliere 12,2 g di tris-(idrossimetil)-amminometano con circa 800 mL di H_2O, quindi diluire fino ad un litro con H_2O;
2.6. soluzione standard di *p*-nitrofenolo (vedi fosfomonoesterasi).

3. Apparecchiatura
3.1. Spettrofotometro UV-VIS;
3.2. pHmetro.

4. Procedimento
Porre 1 g di terreno in un matraccio da 50 mL, aggiungere 0,2 mL di toluene, 4 mL di tampone TRIS-8 ed 1 mL della soluzione di b-PNP 0,005 M. Agitare per alcuni secondi la miscela di reazione. Chiudere il matraccio e porlo in un incubatore a 37°C per 1 ora. Bloccare la reazione mediante aggiunta di 1 mL di $CaCl_2$ 0,5 M e 4 mL di TRIS-NaOH. Agitare il tutto per alcuni secondi, quindi filtrare la sospensione su di un filtro a fascia blu (o Whatman n. 2). Eseguire la lettura spettrofotometrica sul filtrato a 400 nm operando come descritto per le fosfomonoesterasi.

5. Espressione dei risultati
I risultati sono espressi in termini di μg di *p*-nitrofenolo g^{-1} h^{-1}.

Metodo IV.3.3.

Metodo per la determinazione della pirofosfatasi

1. Principio
Il principio del metodo per la determinazione della pirofosfatasi consiste nel determinare spettrofotometricamente a 700 nm il fosfato rilasciato quando il suolo é messo ad incubare con una soluzione tamponata di pirofosfato di sodio.

2. Reattivi
2.1. Idrossido di sodio 1 N;
2.2. acido solforico 0,1 N;
2.3. tampone Universale Modificato (TUM-soluzione madre) (vedi fosfomonoesterasi);
2.4. TUM a pH 8,0 (TUM-8): prelevare 200 mL di TUM-soluzione madre e portarli a pH 8,0 con HCl 0,1 N, diluire quindi fino ad un litro con H_2O;

2.5. soluzione di pirofosfato di sodio 50 mM: sciogliere 2,23 g di $Na_4P_2O_7.10H_2O$ con 20 mL di TUM-8; aggiustare il pH ad 8,0 con una soluzione di HCl 0,1 N, quindi diluire fino a 100 mL con H_2O (preparare la soluzione giornalmente);
2.6. soluzione di acido ascorbico 0,1 M-acido tricloroacetico 0,5 M (Reagente A): sciogliere 8,8 g di acido ascorbico a 41 g di acido tricloroacetico con circa 400 mL di H_2O quindi aggiustare il volume a 500 mL (preparare la soluzione giornalmente);
2.7. ammonio molibdato tetraidrato 0,015 M (reagente B): sciogliere 9,3 g di $(NH_4)_6Mo_7O_2.4H_2O$ con circa 450 mL di H_2O, quindi diluire fino a 500 mL con H_2O;
2.8. citrato di sodio (0,15 M)-arsenito di sodio (0,3 M)-acido acetico (7,5 %) (reagente C): sciogliere 44,1 di citrato di sodio e 39 g di Na_3AsO_3 con circa 800 mL di H_2O, aggiungere 75 mL di acido acetico glaciale (99,9%) e diluire fino ad 1 litro con H_2O;
2.9. soluzione standard di fosfato: sciogliere 0,439 g di KH_2PO_4 con circa 700 mL di H_2O e diluire quindi fino ad 1 litro sempre con H_2O (tale soluzione contiene 100 µg di $P\text{-}PO_4^{-3}$/mL).

3. Apparecchiatura
3.1. Spettrofometro UV-VIS;
3.2. pHmetro.

4. Procedimento
Porre 1 g di terreno in un tubo da centrifuga da 50 ml, aggiungere 3 mL della soluzione di pirofosfato di sodio 50 mM ed agitare per alcuni secondi, chiudere il tubo e porlo ad incubare a 37°C per 5 ore. Dopo incubazione aggiungere immediatamente 3 mL di TUM-8 e 25 mL di H_2SO_4 1 N. Agitare la miscela per almeno 3 minuti, quindi centrifugare la sospensione per 30 secondi a 12.000 rpm. Porre 1 mL di supernatante in un matraccio da 25 mL contenente 10 mL di reagente A, successivamente aggiungere 2 mL di reagente B e 5 mL di reagente C. Dopo agitazione portare a volume con H_2O. Dopo quindici minuti fare la lettura allo spettofotometro a 700 nm.

La concentrazione in $P\text{-}PO_4^{-3}$ viene determinata tramite una retta di taratura costruita con le densità ottiche di soluzioni standard contenenti 0, 5, 10, 15, 20 e 25 µg di $P\text{-}PO_4^{-3}$. (Preparare tali soluzioni diluendo 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mL della soluzione standard di fosfato in matracci da 100 mL e portando a volume con H_2O).

5. Espressione dei risultati
I risultati sono espressi in termini di µg di $P\text{-}PO_4^{-3}$ $g^{-1}h^{-1}$.

Metodo IV.4.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ SOLFATASICA DEL SUOLO

1. Oggetto
Il presente documento fissa un metodo per la determinazione dell'attività solfatasica del suolo.

Metodo IV.4.1.

Metodo per la determinazione della arilsolfatasi

1. Principio
Il principio del metodo, consiste nel determinare spettrofotometricamente il *p*-nitrofenolo rilasciato quando il suolo é messo ad incubare con una soluzione tamponata di *p*-nitrofenilsolfato di sodio eventualmente in presenza di toluene come agente sterilizzante.

2. Reattivi
2.1. Toluene;
2.2 tampone acetato 0,5 M a pH 5,8: sciogliere 68 g di $CH_3COONa.3H_2O$ con circa 700 mL di H_2O, aggiungere 1,70 mL di acido acetico glaciale (99%) e diluire ad un litro con H_2O;
2.3. soluzione di *p*-nitrofenilsolfato di potassio 0,025 M: sciogliere 0,312 g di *p*-nitrofenilsolfato di potassio con circa 40 mL di tampone acetato, quindi diluire fino a 50 mL con il tampone. (Conservare la soluzione in frigorifero);
2.4. cloruro di calcio ($CaCl_2$) 0,5 M. Preparare come descritto per le fosfomonoesterasi;
2.5. idrossido di sodio (NaOH) 0,5 M. Preparare come descritto per le fosfomonoesterasi;
2.6. soluzione standard di *p*-nitrofenolo. Preparare come descritto per le fosfomonoesterasi.

3. Apparecchiatura
3.1. Spettrofotometro UV-VIS;
3.2. pHmetro.

4. Procedimento
Porre 1 g di terreno in un matraccio da 50 mL, aggiungere 0,25 mL di toluene, 4 mL di tampone acetato ed 1 mL di soluzione di *p*-nitrofenil solfato di potassio. Agitare la miscela per alcuni secondi quindi porla ad incubare a 37 °C per un'ora. Bloccare la reazione mediante aggiunta di 1 mL di $CaCl_2$ 0,5 M e 4 mL di NaOH 0,5 M agitando la miscela per alcuni secondi, quindi filtrare la sospensione su filtro a fascia blu (o Whatman n. 2). Sul filtrato eseguire la valutazione del *p*-nitrofenolo rilasciato seguendo le modalità descritte per le fosfomonoesterasi.

5. Espressione dei risultati
I risultati sono espressi in termini di mg di *p*-nitrofenolo g^{-1} h^{-1}.

Metodi IV.5.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEIDROGENASICA DEL SUOLO

1. Oggetto

Il presente documento fissa i metodi per la determinazione dell'attività deidrogenasica del suolo.

Metodo IV.5.1.

Determinazione dell'attività deidrogenasica con iodo-nitrofenilformazano

1. Principio

Il metodo si basa sulla determinazione del prodotto di reazione, iodo-nitrofenilformazano (INTF) dopo incubazione per 2 ore di 1 g di suolo con una soluzione di iodo nitrotetrazoliocloruro (INT). Le determinazioni vanno eseguite entro poche ore dal prelievo, in quanto l'attività può variare considerevolmente con il tempo ed il tipo di suolo.

2. Reattivi

2.1 Substrato: 2 (p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio cloruro (iodonitrofeniltetrazolio, INT).
2.2. 500 mg di INT sono miscelati con 2 mL di N,N-dimetilformammide, agitati vigorosamente, trasferiti in un matraccio da 100 mL, portati a volume con acqua distillata e tappati; si disciolgono con ultrasuoni. La soluzione viene preparata al momento dell'uso e tenuta al buio;
2.3. tampone: TRIS 0.1 M, pH 7.0;
2.4. sciogliere 12.1g di Tris (idrossimetil) aminometano (TRIS) in 800 mL di acqua distillata; neutralizzare con HCl diluito fino a pH 7.0, e portare ad 1 L;
2.5. soluzione estraente del formazano: N,N-dimetilformammide/etanolo (1:1);
2.6. soluzione standard di iodonitrofenilformazano (INTF): valori compresi nell'intervallo 0-30mg/mL^{-1} rientrano nel tratto lineare della retta standard.

3. Apparecchiatura

3.1. Spettrofotometro;
3.2. bagno termostatico;
3.3. agitatore;
3.4. pH-metro.

4. Procedimento

1 g di suolo umido prelevato di fresco è posto in una provetta, miscelato con 1.5 mL di tampone TRIS 1 M, pH 7.0 e 2 mL di substrato INT 0.5 %; per determinare l'attività deidrogenasica "naturale", si aggiunge acqua invece del tampone. Le provette vengono tappate, agitate leggermente e incubate a 40°C al buio per 2 ore. Viene preparato un controllo con suolo autoclavato a 121°C per 20 minuti e trattato come i campioni. Le analisi si preparano in triplo. Dopo 2 ore di incubazione, i campioni vengono trattati con 10 mL della

miscela N,N-dimetilformammide/etanolo, al buio e agitando vigorosamente ogni 20 minuti per 1 ora, per estrarre l'INTF prodotto.
La soluzione ottenuta viene filtrata e immediatamente si eseguono le letture allo spettrofotometro a 464 nm, usando la soluzione estraente come bianco. Il colore è stabile per circa 3 ore; se occorre, si può diluire con la stessa soluzione estraente, per abbassare i valori delle letture.
La concentrazione di INTF prodotto viene calcolata da una retta di taratura che riporta l'assorbanza in funzione di concentrazioni note di INTF.

5. Espressione dei risultati
I valori delle assorbanze relativi ai controlli (che rappresentano la riduzione "chimica" o "abiotica" del substrato) si sottraggono da quelli delle prove.
L'attività deidrogenasica viene espressa in nmoli INTF g^{-1} suolo secco x 2 ore.

Metodo IV.5.2.

Metodo di determinazione dell'attività deidrogenasica semplificato

1. Principio
Il metodo si basa sulla determinazione del prodotto di reazione, iodo-nitrofenilformazano (INTF) dopo incubazione per 20 ore di 1 g di suolo con una soluzione di iodo nitrotetrazoliocloruro (INT).

2. Procedimento
Le determinazioni nei campioni e nei controlli vengono eseguiti in triplo. E' preferibile eseguire le determinazioni entro poche ore dal prelievo, in quanto l'attività può variare considerevolmente con il tempo e a seconda del suolo. Il suolo (1 g) prelevato di fresco viene pesato, posto in provette di vetro pirex, e umidificato al 60% della sua capacità di ritenzione idrica. Si aggiungono 0.2 mL di INT, disciolto allo 0.4% in acqua distillata (per sciogliere l'INT in acqua occorre agitare vigorosamente o utilizzare ultrasuoni). Si pone ad incubare al buio per 20 ore a temperatura ambiente o, se disponibile, in camera buia termostatata a 20°C. Si aggiungono 10 mL di una soluzione estraente composta da tetracloroetilene e acetone (1/1.5), si agita energicamente a mano per 1 minuto (l'estraente si addiziona subito prima di agitare), si filtra su carta Watmann N° 41 (se possibile si centrifuga a 4000 giri min^{-1}, per 5 minuti).
La concentrazione di INTF estratto si determina mediante lettura spettrofotometrica a 490 nm, utilizzando come bianco la soluzione estraente.

3. Espressione dei risultati

Le letture di assorbanza delle prove, sottratte dei valori relativi ai controlli, vengono trasformate in mg INTF mL^{-1} mediante una retta di taratura preparata con concentrazioni note di INTF (1, 2, 2.5, 5.0, 10 mg mL^{-1}) disciolto nella soluzione estraente. L'attività deidrogenasica si esprime come mg di INTF prodotto per g di suolo secco (considerando il contenuto di umidità) per ora di incubazione (mg INTF g^{-1} h^{-1}).
Calcolo:

$$\text{Attività deidrogenasica} = \frac{\mu g\,\text{INTF}}{\text{mL}} \times \frac{10\,\text{mL} + \sum v^*}{\text{g suolo} \times 20\,\text{ore}}$$

v* = volume di acqua necessario per mantenere il suolo al 60% della sua capacità massima di ritenzione idrica + volume di substrato aggiunto.

04A02195

GIANFRANCO TATOZZI, *direttore* FRANCESCO NOCITA, *redattore*

(G403029/1) Roma, 2004 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato S.p.A. - S.

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

CANONI DI ABBONAMENTO ANNO 2004 (*)

Ministero dell'Economia e delle Finanze - *Decreto 24 dicembre 2003* (G.U. *n. 36 del 13 febbraio 2004)*

GAZZETTA UFFICIALE - PARTE I (legislativa)

			CANONE DI ABBONAMENTO
Tipo A	Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi tutti i supplementi ordinari:		
	(di cui spese di spedizione € 219,04)	- annuale	€ **397,47**
	(di cui spese di spedizione € 109,52)	- semestrale	€ **217,24**
Tipo A1	Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi i soli supplementi ordinari contenenti i provvedimenti legislativi:		
	(di cui spese di spedizione € 108,57)	- annuale	€ **284,65**
	(di cui spese di spedizione € 54,28)	- semestrale	€ **154,32**
Tipo B	Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti dei giudizi davanti alla Corte Costituzionale:		
	(di cui spese di spedizione € 19,29)	- annuale	€ **67,12**
	(di cui spese di spedizione € 9,64)	- semestrale	€ **42,06**
Tipo C	Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti della CE:		
	(di cui spese di spedizione € 41,27)	- annuale	€ **166,66**
	(di cui spese di spedizione € 20,63)	- semestrale	€ **90,83**
Tipo D	Abbonamento ai fascicoli della serie destinata alle leggi e regolamenti regionali:		
	(di cui spese di spedizione € 15,31)	- annuale	€ **64,03**
	(di cui spese di spedizione € 7,65)	- semestrale	€ **39,01**
Tipo E	Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata ai concorsi indetti dallo Stato e dalle altre pubbliche amministrazioni:		
	(di cui spese di spedizione € 50,02)	- annuale	€ **166,38**
	(di cui spese di spedizione € 25,01)	- semestrale	€ **89,19**
Tipo F	Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi tutti i supplementi ordinari, ed ai fascicoli delle quattro serie speciali:		
	(di cui spese di spedizione € 344,93)	- annuale	€ **776,66**
	(di cui spese di spedizione € 172,46)	- semestrale	€ **411,33**
Tipo F1	Abbonamento ai fascicoli della serie generale inclusi i supplementi ordinari con i provvedimenti legislativi e ai fascicoli delle quattro serie speciali:		
	(di cui spese di spedizione € 234,45)	- annuale	€ **650,83**
	(di cui spese di spedizione € 117,22)	- semestrale	€ **340,41**

N.B.: L'abbonamento alla GURI tipo A, A1, F, F1 comprende gli indici mensili
Integrando con la somma di € **80,00** *il versamento relativo al tipo di abbonamento alla* Gazzetta Ufficiale - *parte prima - prescelto, si riceverà anche l'Indice Repertorio Annuale Cronologico per materie anno 2004.*

BOLLETTINO DELLE ESTRAZIONI

Abbonamento annuo (incluse spese di spedizione) € **86,00**

CONTO RIASSUNTIVO DEL TESORO

Abbonamento annuo (incluse spese di spedizione) € **55,00**

PREZZI DI VENDITA A FASCICOLI
(Oltre le spese di spedizione)

Prezzi di vendita:		
	serie generale	€ 0,77
	serie speciali (escluso concorsi), ogni 16 pagine o frazione	€ 0,80
	fascicolo serie speciale, *concorsi*, prezzo unico	€ 1,50
	supplementi (ordinari e straordinari), ogni 16 pagine o frazione	€ 0,80
	fascicolo Bollettino Estrazioni, ogni 16 pagine o frazione	€ 0,80
	fascicolo Conto Riassuntivo del Tesoro, prezzo unico	€ 5,00

I.V.A. 4% a carico dell'Editore

GAZZETTA UFFICIALE - PARTE II (inserzioni)

Abbonamento annuo	*(di cui spese di spedizione € 120,00)*		€ **318,00**
Abbonamento semestrale	*(di cui spese di spedizione € 60,00)*		€ **183,50**
Prezzo di vendita di un fascicolo, ogni 16 pagine o frazione (oltre le spese di spedizione)		€ 0,85	

I.V.A. 20% inclusa

RACCOLTA UFFICIALE DEGLI ATTI NORMATIVI

Abbonamento annuo		€ **188,00**
Abbonamento annuo per regioni, province e comuni		€ **175,00**
Volume separato (oltre le spese di spedizione)	€ 17,50	

I.V.A. 4% a carico dell'Editore

Per l'estero i prezzi di vendita, in abbonamento ed a fascicoli separati, anche per le annate arretrate, compresi i fascicoli dei supplementi ordinari e straordinari, devono intendersi raddoppiati. Per il territorio nazionale i prezzi di vendita dei fascicoli separati, compresi i supplementi ordinari e straordinari, relativi ad anni precedenti, devono intendersi raddoppiati. Per intere annate è raddoppiato il prezzo dell'abbonamento in corso. Le spese di spedizione relative alle richieste di invio per corrispondenza di singoli fascicoli, vengono stabilite, di volta in volta, in base alle copie richieste.

N.B. - Gli abbonamenti annui decorrono dal 1° gennaio al 31 dicembre, i semestrali dal 1° gennaio al 30 giugno e dal 1° luglio al 31 dicembre.

Restano confermati gli sconti in uso applicati ai soli costi di abbonamento

ABBONAMENTI UFFICI STATALI
Resta confermata la riduzione del 52% applicata sul solo costo di abbonamento

* tariffe postali di cui al Decreto 13 novembre 2002 (G.U. n. 289/2002) e D.P.C.M. 27 novembre 2002 n. 294 (G.U. 1/2003) per soggetti iscritti al R.O.C.

* 4 5 - 4 1 0 3 0 1 0 4 0 3 1 3 *

€ 3,20